



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Estudio morfológico e inmunohistoquímico del
desarrollo postnatal de la glándula adrenal en crías de
alpaca (*Vicugna pacos*) de 7 a 45 días de edad en
Marangani – Cusco**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Salud Animal

AUTOR

Miluska Beatriz NAVARRETE ZAMORA

ASESOR

Alberto SATO SATO

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Navarrete M. Estudio morfológico e inmunohistoquímico del desarrollo postnatal de la glándula adrenal en crías de alpaca (*Vicugna pacos*) de 7 a 45 días de edad en Marangani – Cusco. [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2017.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN SALUD ANIMAL

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:00 horas del día martes 25 de julio de 2017, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por la MSc. Rosa Amelia Perales Camacho y constituido por los siguientes miembros: MSc. Alberto Sato Sato (Asesor), Dra. Galy Juana Mendoza Torres, Mg. Carlos Reynaldo Medina Sparrow, Mg. Nieves Nancy Sandoval Chaupe, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

“Estudio morfológico e inmunohistoquímico del desarrollo postnatal de la glándula adrenal en crías de alpaca (*Vicugna pacos*) de 7 a 45 días de edad en Marangani- Cusco” presentado por la Bachiller en Medicina Veterinaria:

MILUSKA BEATRIZ NAVARRETE ZAMORA

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **MUY BUENO (18) DIECIOCHO**

A continuación, la Presidenta del Jurado recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del **Grado Académico de Magíster en Salud Animal**, a la Bachiller en Medicina Veterinaria: **Miluska Beatriz Navarrete Zamora**.

Siendo las 12:00 horas del día martes 25 de julio de 2017, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

MSc. Rosa Amelia Perales Camacho (P.P.D.E.)
Presidenta

Dra. Galy Juana Mendoza Torres
Miembro (Externo)

Mg. Carlos Reynaldo Medina Sparrow
Miembro (Externo)

Mg. Nieves Sandoval Chaupe (P.P.D.E.)
Miembro

MSc. Alberto Sato Sato (P.P.D.E.)
Miembro (Asesor)

Dr. César Manuel Cavallia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM

Dedicatorias

A Dios y a aquellos que guiaron mi camino.

*A mis amados padres, Félix y Zenaida, por su amor, su confianza
y el apoyo que siempre me brindaron para mi carrera.*

*A mis hermanos, Verónica y Andrés
y al regalo más hermoso de ser tía: Dayana, María José, Mya y Mikaela.*

Agradecimientos

*Al Dr. Sergio Cueva, en un agradecimiento póstumo, por su confianza,
y por haberme dado la oportunidad de ingresar a las ciencias básicas.*

*Al Dr. Alberto Sato, mi maestro y guía en la docencia
e investigación en ciencias morfológicas, por su amistad,
por dirigir esta tesis y por creer en mí y apoyarme en este
constante crecimiento.*

*A la Facultad de Medicina Veterinaria UNMSM, mi alma mater,
orgullosa de ser sanmarquina y encontrar en ella grandes maestros y colegas.
Gracias a todos los que participaron en mi formación profesional e inspiraron
mis pasos como docente e investigadora.*

*A mis amigos y compañeros, gracias por todo el apoyo y por sobretodo
por su valiosa amistad: Alexander, Francisco, Dr Marcelo Ghezzi, Marco,
Milagros, Eduardo, Nadia, Luz, Yesenia, Sergio, Olga, Rosa, Nieves, Alberto,
Roberto, Boris, María, Gina, César, Felipe, Mercy.*

*La autora desea expresar su agradecimiento al personal de la Estación
Experimental IVITA- Maranganí, por el apoyo brindado en el desarrollo del
presente trabajo. El estudio fue posible gracias al financiamiento del Proyecto
100801131 del CSI-Vicerrectorado de Investigación UNMSM y al Proyecto
PIBAP N° 68 del FINCYT-CONCYTEC.*

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
APENDICE	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1. Generalidades	3
2.2 Características morfológicas de la glándula adrenal	3
2.2.1 Macroscópicas	4
2.2.2 Microscópicas	6
2.3 Función de la glándula adrenal	7
2.4. Estrés	8
III. MATERIALES Y METODOS	11
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
V. CONCLUSIONES	42
VI. RECOMENDACIONES	43
VI. LITERATURA CITADA	44

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Anticuerpos utilizados para IHQ en glándula adrenal de crías de alpaca	14
Cuadro 2.- Reactivos utilizados para IHQ en glándula adrenal de crías de alpaca	14

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación esquemática de las glándulas adrenales de diversas especies de animales domésticos (König y Liebich, 2005).	5
Figura 2. Arquitectura general de la glándula suprarrenal (Junqueira y Carneiro, 2006).	6
Figura 3. Glándulas adrenales de crías de alpaca	19
Figura 4. Glándula adrenal derecha de cría de alpaca	20
Figura 5. Medida de la glándula adrenal izquierda en cría de alpaca.	20
Figura 6. Corteza y médula de la glándula adrenal en cría de alpaca de una semana de edad.	22
Figura 7. Corteza adrenal en cría de alpaca de una semana de edad.	22
Figura 8. Corteza adrenal de cría de alpaca de 15 días de edad	23
Figura 9. Zona glomerular de la corteza adrenal de cría de alpaca de 15 días de edad.	24
Figura 10. Zona fasciculada de la corteza adrenal de cría de alpaca de 15 días de edad.	24
Figura 11. Zona reticular de la corteza adrenal de cría de alpaca de 15 días de edad.	25
Figura 12. Corteza adrenal de cría de alpaca de 21 días de edad.	26
Figura 13. Cápsula engrosada y zona glomerular de la corteza adrenal en cría de alpaca de 21 días de edad.	26
Figura 14. Cápsula engrosada que desprenden tabiques al interior de la corteza adrenal en cría de alpaca de 21 días de edad	27
Figura 15. Corteza adrenal de cría de 1 mes de edad.	28
Figura 16. Zona glomerular de la corteza adrenal de cría de 1 mes de edad	28
Figura 17. Zona fasciculada de la corteza adrenal de cría de 1 mes de edad	29
Figura 18. Zona reticular de la corteza adrenal de cría de 1 mes de edad	29
Figura 19. Tabiques capsulares que septan la corteza adrenal de cría de alpaca de 45 días de edad.	31
Figura 20. Relación corteza y médula adrenal de cría de alpaca de 45 días de edad	31
Figura 21. Zonas cortico- adrenales y médula adrenal de cría de alpaca de 45 días de edad.	32
Figura 22. Zona reticular de la corteza adrenal de cría de alpaca de 45 días de edad.	32
Figura 23. Corteza adrenal de cría de alpaca de 45 días de edad.	33
Figura 24. Marcación positiva a células productoras de cortisol en la zona fasciculada-reticular mediante IHQ en cría de alpaca de 1 mes de edad.	35

Figura 25. Células productoras de cortisol en zona fasciculada de la corteza adrenal en crías de alpaca marcadas con IHQ.	36
Figura 26. Marcación positiva a células receptoras de ACTH en la corteza adrenal mediante IHQ en cría de alpaca de 1 mes de edad.	37
Figura 27. Células receptoras a ACTH en corteza adrenal de crías de alpaca.	38

APENDICE

	Página
ANEXO 1. PROTOCOLO INMUNOHISTOQUIMICA ABC	48

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue conocer el desarrollo macro y microscópico post natal de la glándula adrenal y determinar la presencia de células productoras de cortisol y receptoras de ACTH, mediante estudio inmunohistoquímico (IHQ) de las glándulas adrenales en crías de alpaca. Así mismo se determinó niveles de cortisol en suero. Se emplearon 15 crías de alpacas aparentemente sanas en IVITA Maranganí, Cusco, comprendidos entre los 7 y 45 días de edad, de las cuales 10 eran machos y 5 hembras. Las muestras se trabajaron en los Laboratorios de Anatomía Animal, Fisiología Animal y en la sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Animal FMV UNMSM. Las láminas histológicas se hicieron en la Unidad Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal del SENASA. La ubicación de las glándulas adrenales de las crías de alpaca en la cavidad abdominal fue similar al del caballo y del perro. La glándula adrenal del lado izquierdo fue más grande y de un mayor peso, sin embargo, hasta el mes de edad de las crías de alpaca ambas glándulas tienen un tamaño y peso similar, para luego del mes de edad seguir el patrón morfológico para las especies domésticas. La corteza adrenal fue más desarrollada que la médula adrenal, siendo la zona fasciculada la de mayor dimensión. Las células productoras de cortisol se ubicaron de preferencia en la zona fasciculada de la corteza adrenal; sin embargo, también hay reacción positiva por IHQ en la zona reticular aunque muy suave. Esta reacción fue más notoria en crías de alpaca mayores de 1 mes de edad. Las células receptoras de ACTH en la glándula adrenal se ubicaron principalmente en la zona glomerulosa con una marcación fuerte, mientras que en la zona fasciculada y reticular hubo marcación de forma leve. Se encontró que los valores promedio de cortisol en suero fueron de 1.203ug/dl con DS de 0.632, siendo estos valores en crías mayores del mes de edad, similares a los valores encontrados en terneros.

Palabras claves: Crías de alpaca, glándula adrenal, anatomía, histología, inmunohistoquímica (IHQ), cortisol, ACTH.

ABSTRACT

The stress response is little known in South American camelids. It is considered that glucocorticoids, produced especially cortisol in the adrenal glands, constitute one of the main mechanisms of immunosuppression mediators produced by stress. The aim of this study was to develop macro and microscopic postnatal adrenal gland and the presence of cortisol-producing cells by immunohistochemistry (IHC) of the adrenal glands in baby alpaca between birth and 45 days old. It also was determined in serum cortisol levels. Fifteen apparently healthy baby alpaca were used in IVITA Maranganí, between 7 and 45 days of age, of which 10 were male and 5 female. The samples were worked in the Laboratories of Animal Anatomy, Animal Physiology and in the Ichthyopathology section of the Laboratory of Histology, Embryology and Veterinary Pathology FMV UNMSM. The histological films were made at the Center for the Diagnosis of Animal Health of SENASA. The location of the adrenal glands of baby alpaca in the abdominal cavity was similar to the horse and dog. The left adrenal gland was larger and more weight, however, until the month of age of baby alpaca both glands have a similar size and weight, and then the month-old to follow the morphological pattern for species household. The adrenal cortex was more developed than the adrenal medulla, the zona fasciculata being the larger. Cortisol-producing cells are located preferably in the zona fasciculata of the adrenal cortex, but also there IHC positive reaction in the reticular zone although very soft. This reaction was more pronounced in baby alpaca over 1 month old. The ACTH receptor cells in the adrenal gland were located mainly in the glomerular zone with a strong marking, whereas in the fasciculate and reticular zones there was slight marking. It was found that the mean values of serum cortisol were 1.203ug/dl with DS of 0632, these values being higher in offspring month of age, similar to the values found in calves.

Keywords: Baby alpaca, adrenal gland, anatomy, histology, immunohistochemistry (IHC), cortisol, ACTH.

I. INTRODUCCIÓN

La alpaca es un camélido sudamericano doméstico importante en nuestro país pues es criado principalmente por productores de recursos económicos precarios en las zonas altoandinas siendo la producción de fibra y carne su principal ingreso. La alpaca puede convertir con cierta eficiencia el alimento, principalmente ichu, en productos usados por estos pobladores, aunque esta producción se enfrente a lugares agrestes y fuertes heladas, con alta mortalidad de crías y deficiencias en el control sanitario y reproductivo.

La glándula adrenal es una de las glándulas endocrinas que intervienen directamente en los fenómenos que se desencadenan en un síndrome general de adaptación al producir y liberar al torrente sanguíneo diversas hormonas como son los mineralocorticoides y glucocorticoides producidos en la corteza adrenal; y la adrenalina y noradrenalina producidos en la médula adrenal, pero que sin embargo su estudio macroscópico y microscópico en crías de alpaca ha sido poco estudiado.

Para que se presenten enfermedades en los animales dependen de factores de riesgo como son el tipo de agente infeccioso, las condiciones ambientales adecuadas y la respuesta al estrés por parte del hospedero. Las glándulas adrenales participan directamente en los mecanismos del estrés a través de una activación fisiológica en el hipotálamo, luego en la hipófisis y finalmente en las glándulas adrenales, siendo los glucocorticoides los mediadores de la inmunosupresión producida por estrés. Cuando no existe una respuesta rápida o de adaptación, no hay una adecuada relación de los sistemas nervioso, inmune y endocrino, permitiendo que las crías se encuentren susceptibles a cualquier enfermedad. La frecuencia de estas enfermedades neonatales en crías de alpaca se dan entre la segunda y tercera semana de vida, disminuyendo la producción y limitando las posibilidades de selección y mejoramiento genético.

A través del estudio de glándulas adrenales de crías de alpaca comprendida en estas edades nos permitirá conocer el aspecto macroscópico y microscópico post natal de la glándula adrenal y determinar la presencia de células productoras de cortisol y receptoras de ACTH mediante inmunohistoquímica.

II. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1.Generalidades

Los camélidos sudamericanos (CSA) según lo descrito por Wheeler (1988) comprende cuatro especies, de las cuales dos son domésticas: la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*), mientras que dos especies son silvestres: el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*).

El Perú es el país considerado el principal productor de camélidos sudamericanos representado por 3685500 cabezas de alpacas según el último censo INEI (2012), de las cuales le corresponde a la raza Huacaya un 80.4%, luego la raza Suri con 12.2% y cruzados con 7.3%. La población alpaquera se concentra en la Sierra en un 99.5% donde predomina la raza Huacaya, mientras que en la Costa peruana se encuentra solo el 0.5% de la población alpaquera predominando los capones; en la Selva peruana no se reportan alpacas (INEI, 2012)

El mayor porcentaje de criadores de alpacas son pobladores de la Sierra peruana, pequeños productores que son parte de los estratos sociales más pobres del país, habitan zonas agrestes y carentes de educación, salud, tecnología, así como les es difícil la comercialización de sus productos debido a la falta de infraestructura vial y adecuado manejo de sus animales. En estas comunidades alpaqueras destaca la presencia de la mujer (FAO, 2005).

La ganadería de CSA viene a ser la principal actividad económica de la región altoandina pues son fuente de fibra, carne, de trabajo y de muchos subproductos, destacándose por la eficiencia de estos animales en el uso de la tierra agreste y vegetación escasa en los países donde se concentra la mayor población natural de estas especies como son: Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador y Perú (FAO, 2005).

En la crianza de alpacas y llamas destaca la producción de fibra, fundamentalmente la de alpaca, por su alto valor en los mercados internacionales debido a su fina textura (FAO, 2005). Esto brinda una alternativa de ingreso económico al poblador rural ante la crianza deficiente de otras especies pecuarias tradicionales con muy bajo rendimiento en la altura (CONCYTEC, 2006).

Los CSA poseen una anatomía y fisiología particular que le permiten una buena adaptación a condiciones de altura y en donde existe escasez de forraje. Algunas particularidades son por ejemplo, la forma elíptica de los glóbulos rojos que podría facilitar el transporte de oxígeno en la altura; otra es la mayor capacidad de digestión de la fibra que les permite conservar mayor proporción de nutrientes de los pastos. Los CSA presentan una anatomía digestiva dividida en compartimentos, similar a los rumiantes, pero una conformación anatómica del cuerpo y de las extremidades, similar al equino, que les permitiría moverse con un consumo mínimo de energía, lo que es importante en las condiciones de hipoxia de las grandes alturas. (FAO, 2005).

Por otro lado, según comenta Ameghino y De Martini (1991), el mayor porcentaje de muertes se concentran en la etapa neonatal de la crianza de alpacas, estudio realizado en las organizaciones alpaqueras ubicadas en Puno y Junín pues al parecer los primeros 30 días son los más críticos.

2.2. Características morfológicas de la glándula adrenal

2.2.1. Macroscópicas:

Las glándulas adrenales son glándulas pares, aplanadas y localizadas cranealmente al borde anterior de los riñones. El tamaño de las glándulas depende del tamaño del cuerpo y las condiciones físicas del animal. La glándula izquierda a menudo es más grande que la derecha (Faulkin *et al.*, 1967). La glándula adrenal izquierda queda a algunos centímetros por delante del riñón del mismo lado, y se ubica a la izquierda de la arteria mesentérica craneal (Habel, 1968).

Las glándulas adrenales en los animales corresponderían a las glándulas suprarrenales en los humanos (Gélvez, 2009). La glándula adrenal está conformada por una corteza y una médula, considerándose fisiológicamente más importante a la corteza, que favorece el mantenimiento de la homeostasis (Gonzales, 1994).

König y Liebich (2005) señalan que las glándulas adrenales en los animales domésticos se desarrollan bilateralmente, pero a pesar de su ubicación cercana a los riñones, no tienen relación funcional con éstos. La forma de ambas glándulas adrenales en las especies domésticas es bastante irregular (Figura 1).

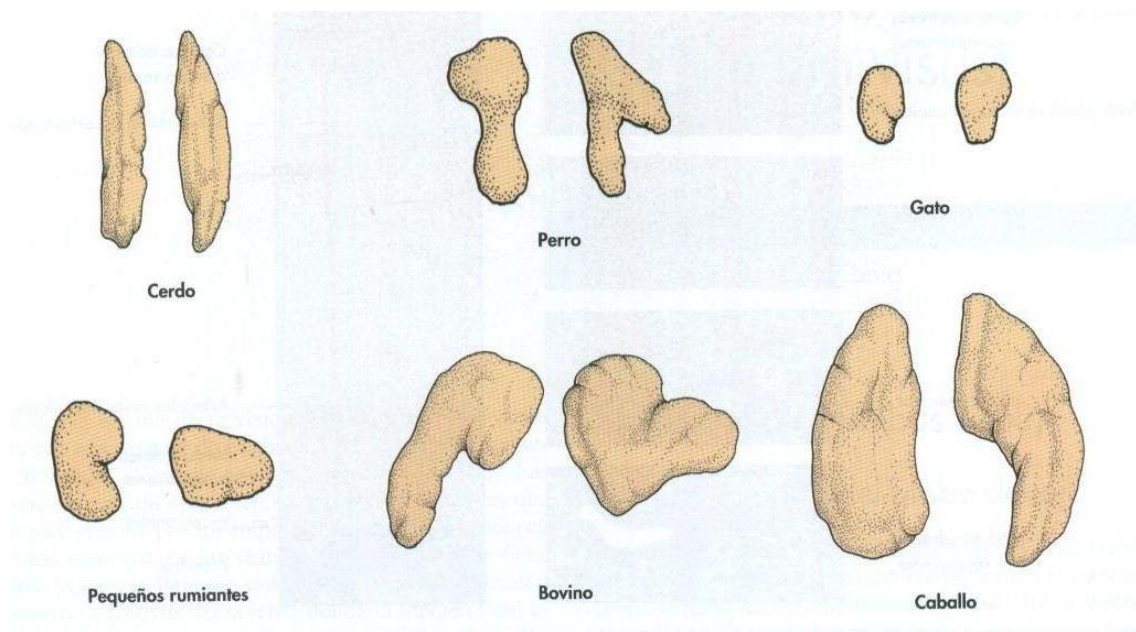


Figura 1. Representación esquemática de las glándulas adrenales de diversas especies de animales domésticos (König y Liebich, 2005).

La alpaca adulta presenta dos glándulas adrenales, derecha e izquierda. La derecha tiene forma alargada y la izquierda ligeramente prismática. El peso y tamaño son muy semejantes comparativamente a la oveja (Núñez, 1968).

La corteza tiene un color cremoso o amarillento según sea su contenido lipóideo. Las adrenales de los rumiantes y cerdos no son muy coloreadas, dada su poca cantidad de lípidos. En el caballo, perro, gato y pollo, la corteza adrenal es de color más cremoso o amarillento debido a su mayor cantidad de lípidos. La médula es de color rojo oscuro, por la abundante red de venas (Sisson *et al.*, 1990)

En el ser humano y en algunos otros animales, la glándula suprarrenal del recién nacido es proporcionalmente mayor que la del adulto porque existe una capa conocida como corteza fetal o provisional entre la médula y la delgada corteza definitiva (Junqueira y Carneiro, 2006).

2.2.2. Microscópicas:

Las glándulas adrenales tienen diferente origen embriológico, la corteza es de origen mesodérmico, mientras que la médula proviene del ectodermo del tejido simpático, considerándose a esta última como un paraganglio simpático (König y Liebich, 2005).

Junqueira y Carneiro (2006) describen la arquitectura general de la glándula adrenal conformado por una cápsula, un plexo arterial subcapsular, una corteza adrenal dividida en tres zonas: glomerular, fascicular y reticular, y una médula adrenal, con una gran vena suprarrenal. (Figura 2).

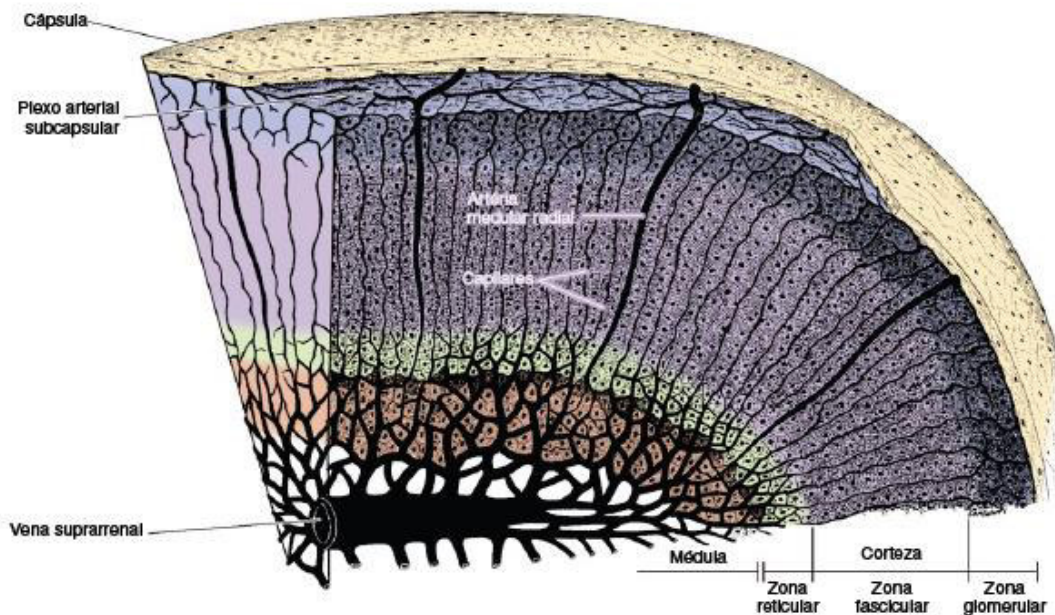


Figura 2. Arquitectura general de la glándula suprarrenal (Junqueira y Carneiro, 2006).

Montalvo (1977) realizó un estudio histológico a las glándulas adrenales de 25 alpacas adultas empleando diversas coloraciones como fueron Hematoxilina-eosina, varios tricrómicos (Mallory, Shorr y Gomory) y sudan IV en cortes en criostato. Definiendo en la corteza tres zonas: una periférica formando arcos celulares, una intermedia más desarrollada con gotas de lípidos y una interna formada por cordones celulares en forma de red, entre todas estas zonas se encuentran muchos capilares sinusoides; luego le continúa la médula.

2.3. Función de la glándula adrenal

Las glándulas adrenales son imprescindibles para la vida; cuando faltan o no segregan hormonas, aparecen alteraciones del equilibrio iónico y del metabolismo glucídico que conducen a la muerte. En cada glándula se distingue una región cortical, la corteza, que produce hormonas esteroideas, vitales, y otra región central o medular, la médula, que segrega catecolaminas, no estrictamente necesarias. La corteza viene a ser el 80% de la glándula y el 20% restante corresponde a la médula. Las funciones endocrinas en ambas regiones son muy distintas y también difieren por su origen embriológico, que para la corteza es mesodérmico, a partir del epitelio celómico próximo al rodete germinal, lo que explica su parentesco químico entre las hormonas adrenocorticales y las gonadales; mientras que el de la médula es neuroectodérmico, con células equivalentes a la de los ganglios simpáticos, aunque modificadas (Barber y Ponz, 2000).

Dal Zotto (2002) menciona que la corteza adrenal se divide en tres zonas histológicamente distintas: 1) zona glomerular o externa, que se sitúa debajo de la capa de tejido conjuntivo y que secreta mineralocorticoides principalmente aldosterona, la cual regula el balance de agua, el balance de sodio y el equilibrio osmótico, 2) zona fascicular o intermedia y la más ancha de las tres, que secreta glucocorticoides (en el hombre y otras especies el glucocorticoide principal es el cortisol y en los roedores la corticosterona), el cortisol y la corticosterona regulan el metabolismo de las proteínas, los hidratos de carbono y las grasas (Gázquez y Blanco, 2004) (Gélvez, 2009); 3) zona reticular, que es la más interna y delgada, secreta hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos) que regulan las características sexuales del macho (König y Liebich, 2005) pero normalmente en cantidades pequeñas con poco efecto sobre la función reproductora.

Por tanto, la mayor cantidad de hormonas se dan en la corteza adrenal y son el cortisol o corticosterona, que son típicos glucocorticoides, secretados en la zona fasciculada; la aldosterona, que es un mineralocorticoide, secretada por la zona glomerular y los andrógenos, principalmente testosterona, secretada en la zona reticular (Akers y Denbow, 2013).

La médula adrenal secreta dos hormonas, la adrenalina que se incrementa como respuesta al estrés inmediato; y la noradrenalina, que mantiene normal la circulación de la sangre mediante la regulación de la presión arterial (Gázquez y Blanco, 2004) (König y Liebich, 2005).

2.4. Estrés

Álvarez (2007) hace referencia que para la presentación de ciertas enfermedades, es el estrés uno de los factores de riesgo. Por lo que Álvarez (2007) define estrés “como la respuesta de un organismo a una demanda que le obliga a cambiar o adaptarse. La manera en la que un animal responda a estas demandas determinará su conducta. Cualquier estímulo recibido causa estrés y éste es el determinante que hace que un organismo se adapte. Los mecanismos del estrés consisten en una activación del eje hipotálamo- hipófisis- adrenales, aumento de glucocorticoides en el torrente circulatorio y de la liberación de catecolaminas y activación del componente simpático. Ante una situación de estrés (miedo, hambre, daño físico, etc) el hipotálamo hace que la hipófisis anterior libere hormona ACTH, la cual actúa sobre la corteza de las glándulas adrenales para que éstas a su vez liberen glucocorticoides. En grados altos de estrés, estos glucocorticoides tienen efecto inmunosupresor (inhibiendo a los linfocitos T colaboradores de clase 1 y a los macrófagos)”.

Álvarez (2007) también indica que “debido a su complejidad, la interrelación de la inmunidad con la neurología y la endocrinología aun no está completamente comprendida, pero existen sólidas evidencias de la comunicación tridireccional entre los sistemas inmune, nervioso y endocrino. El estrés cursará con elevación de sus principales indicadores: cortisol, aldosterona y colesterol. En el medio interno se producirá una hiperglucemia, que junto a las alteraciones hematológicas son los cambios más típicos del estrés: leucocitosis, neutrofilia, linfopenia y eosinopenia (leucograma del estrés). Por tanto, los estresores pueden afectar la salud del individuo aumentando la susceptibilidad a las infecciones. El SN, el sistema endocrino y el sistema inmune constituyen un integrado y único sistema de defensa”.

Coppo (2004) menciona que el estrés incluye diestrés, con consecuencias negativas para el animal sometido a estrés, y eustrés, con consecuencias positivas para el sujeto estresado. Se entiende por eustrés cuando la respuesta del animal al estrés favorece la adaptación al factor estresante; pero si la respuesta del animal al estrés no favorece o dificulta la adaptación al factor estresante, entonces se le conoce como diestrés. Tanto en eustrés y diestrés hay igual liberación de cortisol. “Disturbios de distinta naturaleza, incluyendo cambios sociales, emocionales y alimentarios, generan un mecanismo neuroendocrino de defensa (síndrome general de adaptación), tendiente a restaurar la armonía homeostática. Tal esfuerzo se desarrolla en tres etapas consecutivas, denominadas fase de alarma simpática (breve, fugaz), fase de resistencia (duradera, estrés) y fase de agotamiento (pérdida de la adaptación y ruptura del estado de salud, diestrés). Inicialmente, las tensiones provocan que el sistema nervioso accione sobre la médula adrenal liberando catecolaminas, pero si la sobrecarga continúa operando se estimulará la corteza adrenal, con secreción de gluco y mineralocorticoides”

Es conocido que el vivir en la altura significa someterse a un medio donde predomina una baja presión de oxígeno. Ante esta situación difícil, el organismo responde en diversas formas para obtener una adaptación a este medio hipóxico, las cuales pueden ser diferentes de acuerdo a la magnitud de la hipoxia. La hipoxia de altura, resulta ser un estímulo agreste para la fisiología del nativo de altura, la cual para mantener el medio interno requiere modificar el funcionamiento adrenal (Gonzales, 1994).

Gutiérrez *et al.*, (2001) comenta algunos aspectos adaptativos que presentan los camélidos sudamericanos que “al igual que ocurre con el hombre y otras especies mamíferas, la respuesta de los camélidos sudamericanos a la exposición a altas latitudes es un incremento en la concentración de hemoglobina y una disminución de la afinidad del oxígeno por la sangre. Sin embargo, la llama y la vicuña de los andes no muestran esta clase de adaptación. Incluso a altísimas altitudes, su hematocrito es usualmente bajo y su afinidad por el oxígeno es la mayor de las conocidas de entre los mamíferos. Adicionalmente, estas especies están caracterizadas por una alta densidad capilar de los músculos y un peso relativamente mayor del corazón”.

Los niveles de glucocorticoides, especialmente el cortisol, son los indicadores más usados para evaluar el estrés. El cortisol se ha medido en plasma, suero, heces y saliva de bovinos; los niveles de cortisol son influidos por ritmos circadianos y sus episodios de liberación son casi siempre irregulares (Dantzer *et al.*, 1993).

Guerra-García *et al.*, (1975) en La Raya, Puno, estudió el cortisol mediante RIA en 14 alpacas hembras y 14 machos adultos, observando gran variación individual en la respuesta, siendo siempre mayor la concentración en las hembras, indicando que en “la alpaca la hormona glucocorticoide más importante sería la corticosterona”.

La respuesta al estrés es poco conocida en camélidos sudamericanos. Florez (1997) midió cortisol y los cambios de dinámica sanguínea en vicuñas posteriormente a la captura y esquila, comparándolo con muestras basales tomadas a animales que no fueron sometidos a manejo alguno, encontrando diferencia significativa entre los grupos, siendo mayor el nivel de cortisol en animales luego del manejo.

Bravo *et al.*, 2001 reporta concentraciones de cortisol que fueron determinados durante los períodos perinatales y de destete en alpacas. 50 machos y 50 hembras fueron escogidos al azar (25 en cada período) para la colección de sangre durante el día de parto, 3 y 5 días después del nacimiento. Para el período de destete, las muestras de sangre fueron recogidas 2 días antes, durante el día de destete (0), y al 3er y 5to día después del destete. El cortisol fue determinado usando un protocolo ELISA validado para alpaca. No hubo ninguna diferencia ($P > 0.05$) en concentración de cortisol en ambos períodos: perinatal y destete entre crías machos y hembras. El cortisol estuvo elevado el día del parto (125.8 ng/ml) y luego disminuyó a 27.2 ng/ml a los 3 días después del nacimiento ($P < 0.05$). Al contrario, el cortisol era de 32.5 ng/ml 2 días antes del destete y luego aumentó al día 3 a 64.7 ng/ml ($P < 0.05$), pero entonces disminuir a 29.4 ng/ml en el día 5 después del destete. Por tanto, el cortisol es elevado en alpacas recién nacidas y luego disminuye al tercer y quinto día después del nacimiento. Las concentraciones de cortisol también aumentan después del destete y disminuyen 5 días después del destete.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

El presente estudio se realizó en la localidad de Maranganí, provincia de Canchis, departamento de Cusco, por encima de los 3500 msnm durante enero a marzo del 2010. Las muestras fueron colectadas en el IVITA Maranganí y procesadas en la Facultad de Medicina Veterinaria UNMSM y en la Unidad Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal del SENASA en Lima.

Tamaño y recolección de muestras

Se emplearon 15 crías de alpacas aparentemente sanas, 10 machos y 5 hembras, de los cuales 3 eran de 7 días de edad, 3 de 15 días de edad, 3 de 21 días de edad, 3 de 30 días de edad y 3 de 45 días de edad. Las crías fueron compradas a productores alpaqueros que llevaban registros de empadre y nacimiento y que las vendieron por descarte debido a que presentaban características fenotípicas no deseables en la producción (fibra de diversos colores, presencia de ojo zarco, mal aplome en los miembros, machos criptorquídeos, etc.)

Términos de ética:

El número de animales dependió de su adquisición en productores alpaqueros de la provincia de Canchis, departamento de Cusco. Todas las crías fueron empleadas en diversos trabajos de investigación de la Facultad financiados por Proyecto PIBAP N° 68 del FINCYT-CONCYTEC.

Metodología

El manejo y sacrificio de los animales se realizó siguiendo los “Principios Directrices Internacionales para la Investigación Biomédica que implique el Uso de Animales” del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), Ginebra, 1985.

a) Muestreo de sangre:

Antes de la eutanasia de los animales, usando la vena yugular, se colectó 2cm de sangre de cada animal en tubos sin EDTA para separar el suero. Este suero se congeló a -176°C en nitrógeno líquido dentro de la hora post muestreo. Se transportó al Laboratorio de Fisiología FMV UNMSM para su procesamiento. Se determinó cortisol por medio de RIA usando un kit comercial.

b) Eutanasia y apertura del animal:

Se procedió a la anestesia del animal usando pentobarbital sódico (Halatal®) a razón de 10 mg/Kg, vía endovenosa a través de la vena yugular, para luego proceder a su eutanasia usando sobredosis de este anestésico.

Una vez eutanasiado el animal, se colocó de posición decúbito dorsal. Se realizó un corte a nivel de la línea media del abdomen desde la región xifoidea a la extremidad craneal de la sínfisis púbica. Se seccionó la pared abdominal mediante dos cortes transversales de la región umbilical hacia el lado derecho e izquierdo respectivamente, a nivel del arco costal y la otra a nivel de la protuberancia pélvica. Se hizo un corte del músculo diafragma y se cortó las costillas con el costótomo por la articulación condrocostal. Se removió el omento mayor de su inserción natural, retirando los órganos abdominales para visualizar las glándulas adrenales.

c) Anatomía de la Glándula Adrenal:

1. Se observó la posición, forma y relación con cada riñón para su descripción.
2. Se midió el tamaño de cada glándula adrenal (largo, ancho y espesor), para luego ser retirada y pesada.
3. Se tomó el peso de cada glándula adrenal usando una balanza digital en gramos.

4. El estudio anatómico *in situ* se realizó en la misma estación IVITA Maranganí y la evaluación de resultados se realizó en el Laboratorio de Anatomía Animal y Fauna Silvestre FMV – UNMSM.
5. Se usó la Nómina Anatómica Veterinaria (NAV, 2012) para la redacción de resultados.

d) Histología e Inmunohistoquímica de la Glándula Adrenal:

1. Para el estudio histológico e inmunohistoquímico se colectó toda la glándula adrenal en frascos y fijadas en formol bufferado al 10%, rotuladas y transportadas a Lima para su procesamiento.
2. La reducción de los tejidos se realizaron en el laboratorio de Fisiología Animal FMV UNMSM. Se tomó una muestra transversal de aproximadamente 0.5cm de ambas glándulas adrenales que abarcó corteza y médula, se fijaron en formol bufferado al 10% envueltas en gasa y se mandaron a preparar láminas histológicas con coloración Hematoxilina – Eosina (H-E) a la Unidad Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal del SENASA.
3. Los tacos de los cortes histológicos fueron usados también para cortes en láminas positivadas con Poli L lisina (P 8920, Sigma-Aldrich), que se usaron en el Laboratorio de Fisiología Animal FMV – UNMSM para el estudio de presencia de células productoras de cortisol por inmunohistoquímica para lo cual se empleó un anticuerpo primario policlonal de conejo anti humano 11 β HSD2 (11 β hidroesteroide deshidrogenasa) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Ca, USA) que es específico para células productoras de corticoides determinándose de esta manera las células productoras de cortisol (cuadro 1)
4. Se prepararon también láminas positivadas con Poli L lisina (P 8920, Sigma-Aldrich), para el estudio de presencia de células receptoras de ACTH por inmunohistoquímica, empleándose un anticuerpo primario policlonal Anti-Melanocortin Receptor 2 (extracelular) (cuadro 1)
5. Se empleó un kit comercial para inmunohistoquímica (cuadro 2)
6. Se empleó de control positivo, cortes histológicos de glándulas adrenales de rata (Gantz y Fong, 2003) y como control negativo interno, la no marcación de contenido sanguíneo.

Cuadro 1.- Anticuerpos utilizados para IHQ en glándula adrenal de crías de alpaca.

Anticuerpo (tipo)	Fuente	Huésped	Laboratorio	Dilución	Cat. N°
11 β -HSD2 (H-145) (Policlonal)	Conejo	Rata, ratón, humano	Santa Cruz Biotechnology, INC.	1 : 100	sc-20176
Anti-Melanocortin Receptor 2 (extracelular) (MC2R, Adrenocorticotropin hormone receptor, ACTH-R) (Policlonal)	Conejo	Rata	Alomone Labs Ltd. www.alomone.com	1 : 100	AMR-022

Cuadro 2.- Reactivos utilizados para IHQ en glándula adrenal de crías de alpaca.

Reactivos	Laboratorio	Dilución Optima	Cat. N°
ImmPACT DAB Peroxidase Substrate	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010	30 μ l de cromógeno en 1 ml. de diluyente.	SK-4105
ImmunoCruz® rabbit ABC Staining System	Santa Cruz Biotechnology, INC.	Listo para uso. Provisto por el fabricante.	sc-2018

Procedimiento:

La técnica de inmunohistoquímica incluyó el tratamiento de las láminas que pasaron por una etapa de desparafinado con Neo Clear (sustituto de xileno) en dos tiempos de 15 minutos cada uno. Se prosiguió con la hidratación mediante dos pasajes de 10 minutos por etanol al 100%, continuando con el bloqueo de la peroxidasa endógena al pasar las láminas por una solución que constaba de 200 ml. de metanol y 4 ml de agua oxigenada durante 30 minutos.

Se prosiguió con la hidratación mediante pasajes en alcohol en diluciones decrecientes en concentración: 96° (en dos oportunidades), 70°, 50°, por 5 minutos cada pasaje;

continuándose con tres lavados en solución buffer fosfato salino (PBS) por 5 minutos cada lavado. Posteriormente, la recuperación antigénica se realizó en solución buffer citrato (estandarizada a pH 6 con HCl) en horno microondas a 750 watts por 10 minutos, dejándose enfriar. Se realizó tres nuevos lavados en solución PBS por 5 minutos cada uno.

La inactivación de uniones inespecíficas se realizó con Albumina de Suero Bovino (BSA) al 1% en cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente. La aplicación de los anticuerpos primarios (anti 11 β HSD2 y anti ACTH, ambos en dilución al 1:100) se realizó en cámara húmeda donde reposaron en refrigeración (4°C) hasta el día siguiente. Se continuó con tres lavados en solución PBS, por 5 minutos cada lavado, para proseguir con la aplicación del anticuerpo secundario (policlonales en ambos casos) en cámara húmeda por 30 minutos, repitiéndose tres lavados en solución PBS, por 5 minutos cada lavado.

Se procedió a aplicar la enzima AB en cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente, repitiéndose tres lavados en solución PBS, por 5 minutos cada lavado, antes del revelado que se realizó con el cromógeno 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), que se aplicó y evaluó la aparición de marcación, que se presentó a los 2 minutos 25 segundos para anti 11 β HSD2 y 5 minutos 25 segundos para anti ACTH, cortándose la reacción con agua corriente. Se realizó un enjuague con agua corriente y otro con agua destilada por 5 minutos cada lavado, previo a la aplicación del colorante de contraste: Hematoxilina de Harris, que se aplicó por 5 segundos, enjuagándose con agua corriente para eliminar el excedente de colorante.

Se continuó con la deshidratación mediante pasajes de 5 minutos cada uno en: alcohol 50°, alcohol 70°, alcohol 96° (en dos oportunidades), etanol al 100% (en dos oportunidades) y Neo Clear (también en dos oportunidades), para finalmente realizar el montaje con la aplicación de Bálsamo de Canadá durante 10 segundos previos al montaje de la lámina cubreobjetos, dejándose durante 48 horas para un correcto secado y posterior limpieza de las láminas.

e) Análisis de imágenes:

La lectura de las láminas para la descripción histológica e inmunohistoquímica se realizó en la sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria FMV-UNMSM usando un microscopio binocular Leica DM750 con cámara digital ICC50 HD/ incorporada y software de medición LAS 4.7 Leica Macrosystems.

En las láminas preparadas mediante inmunohistoquímica se describió las zonas de marcación positiva como zonas con presencia de células productoras de cortisol y células receptoras de ACTH. La intensidad de la marcación por IHQ se clasificó como 0= sin marcación; 1= marcación leve y 2= marcación fuerte (Zanuzzi, 2010; Yang *et al.*, 2011).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio anatómico de la glándula adrenal en crías de alpaca

Las glándulas adrenales de las crías de alpaca fueron dos glándulas endocrinas de forma algo arriñonada, siendo la derecha más alargada y la izquierda algo prismática, presentando dos caras, dorsal y ventral, y también dos bordes, uno lateral y otro medial (Figura 3). La forma de las glándulas adrenales son completamente irregulares, König y Liebich (2005) indican por ejemplo que en el perro la glándula adrenal derecha tiene forma de número uno y la glándula adrenal izquierda tiene forma de número ocho. Climent *et al.*, (2005) menciona que la forma de las glándulas es distinta en cada una de las especies domésticas, e incluso varía con cada individuo. Aunque son generalmente alargadas, las glándulas adrenales son a menudo asimétricas y bastante irregulares, siendo moldeadas por los vasos sanguíneos vecinos (Dyce *et al.*, 2003)

La glándula adrenal izquierda de las crías en estudio estuvo situada craneal a la extremidad craneal del riñón izquierdo mientras que la glándula adrenal derecha estuvo craneomedial al riñón derecho. Ambas estuvieron cubiertas de grasa y cerca de la arteria aorta abdominal y la vena cava caudal, siendo retroperitoneales. La glándula adrenal derecha se situó entre la vena cava caudal y el riñón del mismo lado, mientras que la glándula del lado izquierdo, entre el riñón de este lado y la arteria aorta, similar que en el caballo y el perro descritos por Sisson *et al.*, 1990. La glándula adrenal derecha se ubicó ventral a la altura del cuerpo de la 12va.vértebra torácica mientras que la glándula adrenal izquierda se ubicó ventral a la altura del cuerpo de la 3era.vértebra lumbar. Domínguez *et al.*, 2012 describe ésta posición sublumbar de las glándulas adrenales, similar en llamas adultas, difiriendo en peso y tamaño. En los bovinos

el riñón izquierdo es flotante, sin embargo las glándulas suprarrenales mantienen su situación respecto a la arteria aorta y a la vena cava caudal (Climent *et al.*, 2005)

Ambas glándulas se hallaron cubiertas por una gruesa cápsula. El hilio se halló ubicado en el borde dorsal. El borde ventral fue convexo, redondeado y más ancho que el dorsal. La cara lateral fue convexa y la medial lisa y cóncava. El extremo craneal fue puntiagudo, mientras el caudal fue redondeado.

Macroscópicamente al corte, presentó dos capas concéntricas: una periférica de color amarillenta que es la corteza adrenal y otra central, de color gris que sería la médula adrenal (Figura 4). En el centro del corte de la médula adrenal se pudo reconocer una vena central, lo cual según König y Liebich (2005) permite diferenciar esta glándula de un corte de nódulo linfático. Las glándulas adrenales de las crías de alpaca carecieron de conductos excretores.

La irrigación arterial de las glándulas adrenales de las crías de alpaca estudiadas se originó de la arteria aorta abdominal y arterias renales. Dyce *et al.*, (2003) indica que las glándulas suprarrenales son vascularizadas por pequeñas ramas de varios troncos arteriales vecinos, como son la arteria aorta abdominal, las arterias renales, las lumbares, la arteria frénica abdominal y la arteria mesentérica craneal; Climent *et al.*, (2005) menciona que estas arterias abordan la periferia de las glándulas formando alrededor un plexo capsular para luego introducirse en profundidad para irrigar la médula adrenal y formarse varios capilares que se convierten en la médula en vénulas acumulándose en la vena central y luego por venas colectoras conducen la sangre a la vena cava caudal o un afluente, que puede ser la vena renal, o en ambas.

El tamaño de la glándula adrenal del lado derecho (largo, ancho, espesor) fue en promedio de 1.5 x 0.9 x 0.3cm, mientras que el tamaño de la glándula adrenal del lado izquierdo fue en promedio de 1.5 x 1.1 x 0.3cm. (Figura 5). Dyce *et al.*, (2003) al respecto indica que “es difícil especificar el tamaño de las glándulas adrenales ya que parece estar influenciada por varios factores, por ejemplo, son relativamente más grandes en animales silvestres que en animales domésticos, en individuos jóvenes que en adultos, y en hembras preñadas y lactantes que en aquellos ejemplares inactivos reproductivos”

El peso de la glándula adrenal del lado derecho fue en promedio de 5.3g con DS de 1.0g, mientras que el peso del lado izquierdo fue en promedio de 5.7g con DS de 1.5g.

Estos resultados confirman que generalmente la glándula adrenal del lado izquierdo es más grande y de un mayor peso como lo describe Faulkin *et al.*, 1967 y Núñez, 1968; sin embargo, hasta el mes de edad de las crías de alpaca ambas glándulas tuvieron un tamaño y peso similar, inclusive el del lado derecho fue más grande, para luego del mes de edad seguir el patrón morfológico para las especies domésticas. No hubo diferencia en el tamaño y peso de las glándulas entre crías de diferente sexo.

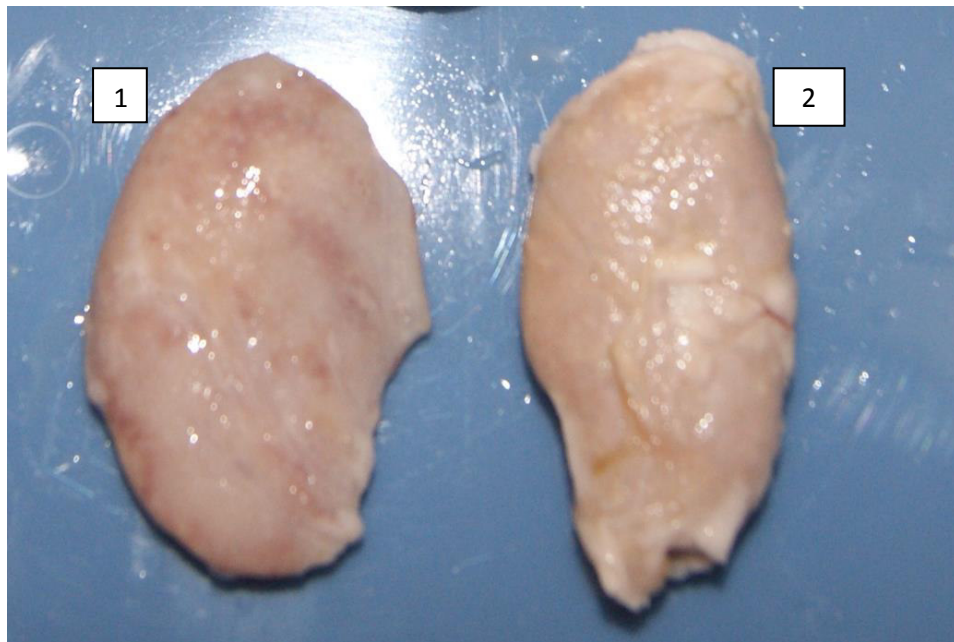


Figura 3. Glándulas adrenales de crías de alpaca. 1. Glándula adrenal izquierda. 2. Glándula adrenal derecha.

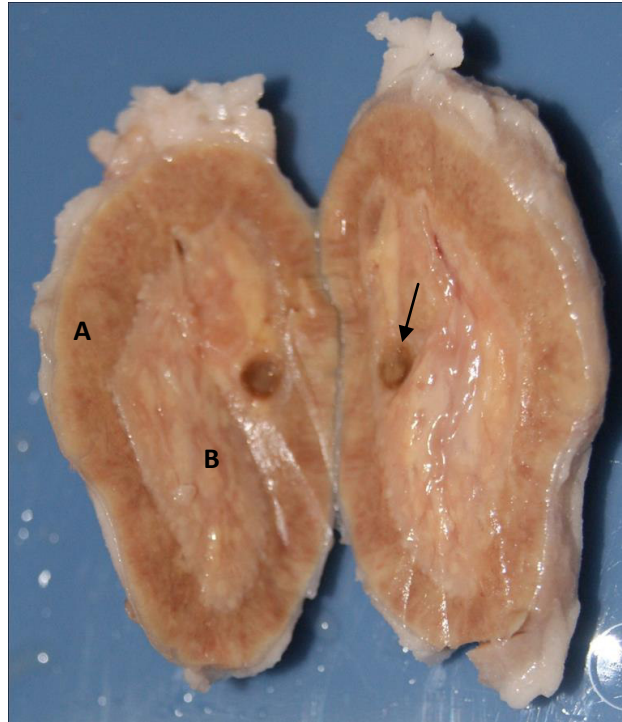


Figura 4. Glándula adrenal derecha de cría de alpaca. A. Corteza adrenal. B. Médula adrenal. La flecha indica una sola vena central.

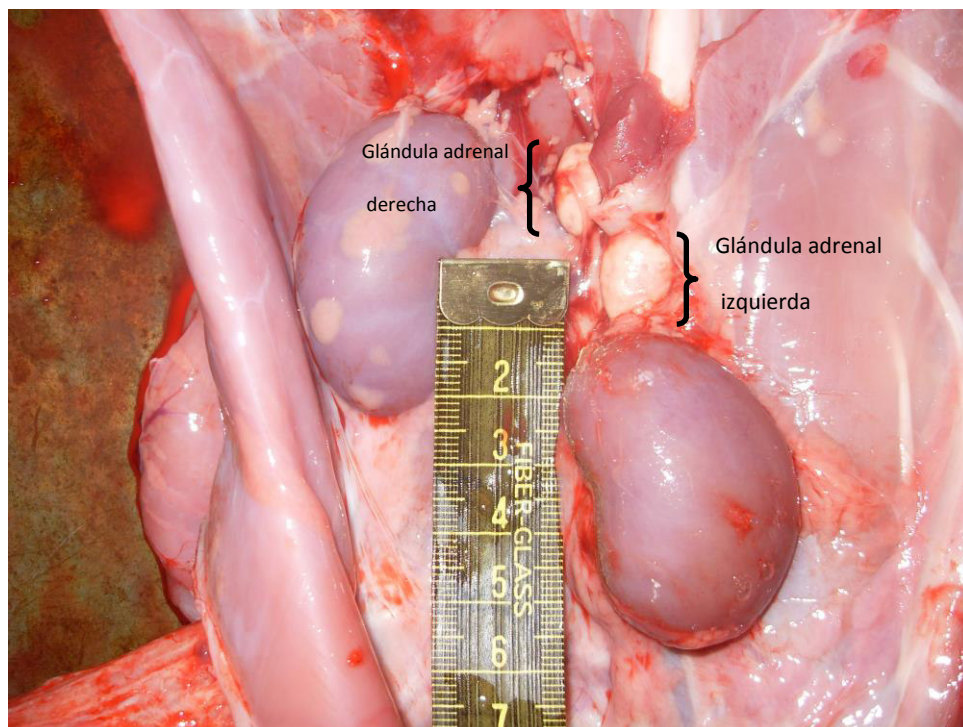


Figura 5. Medida de la glándula adrenal izquierda en cría de alpaca.

Estudio histológico de la glándula adrenal en crías de alpaca

En la primera semana de vida de la alpaca, la glándula adrenal presenta una cápsula delgada y disgregada. Las arteriolas presentan fenestraciones hacia la luz. La superficie presenta tejido conectivo con pequeñas irregularidades a manera de depresiones hacia la corteza. También se observan áreas con evidencia de estructura nerviosa. Se observó tejido conectivo laxo en lugar de tejido adiposo.

La relación entre corteza y médula adrenal es de 2:1 (Figura 6). En la corteza se ven las tres capas corticales: zona glomerular, fasciculada y reticular (Figura 7). Siendo la zona fasciculada la más desarrollada de la corteza adrenal.

La zona glomerular en alpacas de una semana de edad se tiñe más basófilo, presenta grupos de células redondas con menos citoplasma y el núcleo bastante grande y pronunciado mayormente basofílico. El citoplasma ligeramente espumoso. Los grupos de células están rodeadas por tejido conectivo delgado que se desprende de la cápsula, formando islas como acinos de distintos tamaños.

La zona fasciculada, presenta células intensamente basófilas, más grandes dispuestas a manera de cordones, observándose el citoplasma mucho más espumoso. Estas células son más poliédricas y más grandes. El núcleo es grande y se ubica en el centro de la célula. En algunas zonas se observa que existe un tejido conectivo que produce trabéculas más gruesas como tabiques ligeramente engrosadas desde la cápsula hacia la zona reticular.

La zona reticular es una zona más ancha y desarrollada. Presenta células más globosas, citoplasma claro, algunas con un puntilleo basófilo. Se entremezclan con las células de la médula. El núcleo suele ubicarse a los polos de las células.

La médula es la zona más pequeña de toda la glándula adrenal en esta edad de la alpaca. La médula presenta células poliédricas pequeñas, núcleo débilmente basófilo y citoplasma acidófilo, rodeado de muchos vasos sanguíneos.

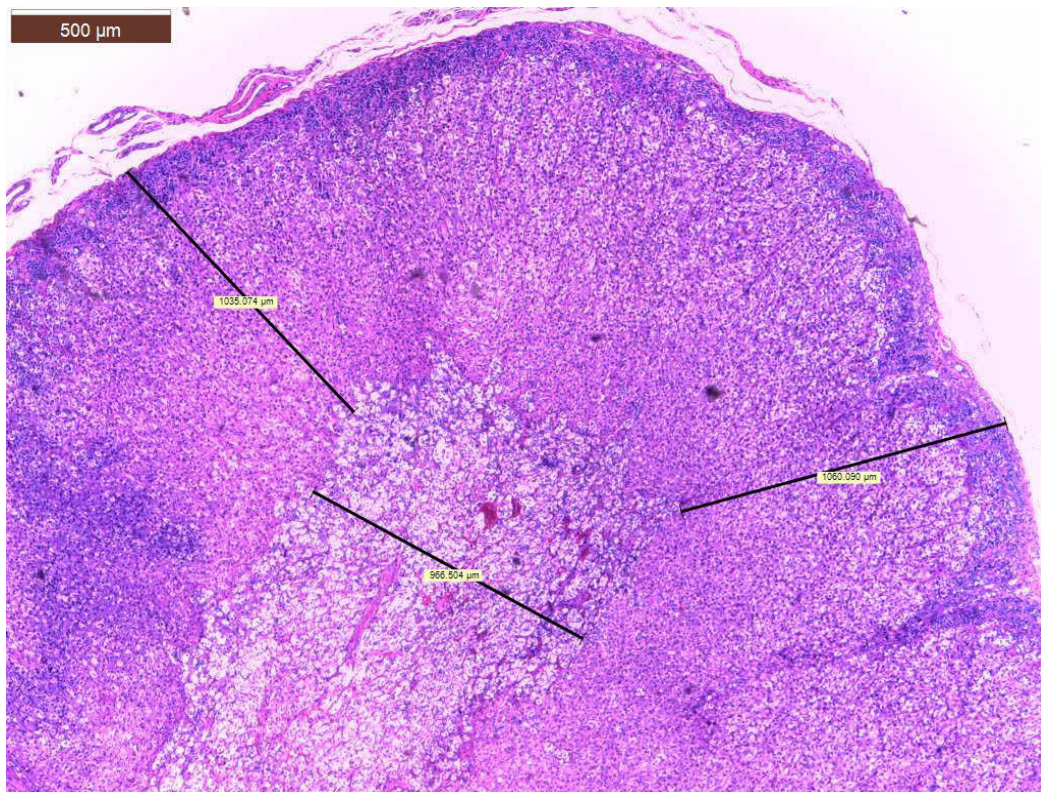


Figura 6. Corteza y médula de la glándula adrenal en cría de alpaca de una semana de edad. Se puede observar que la corteza y la médula llevan una relación de 2:1 en dimensión. (H-E 5X)

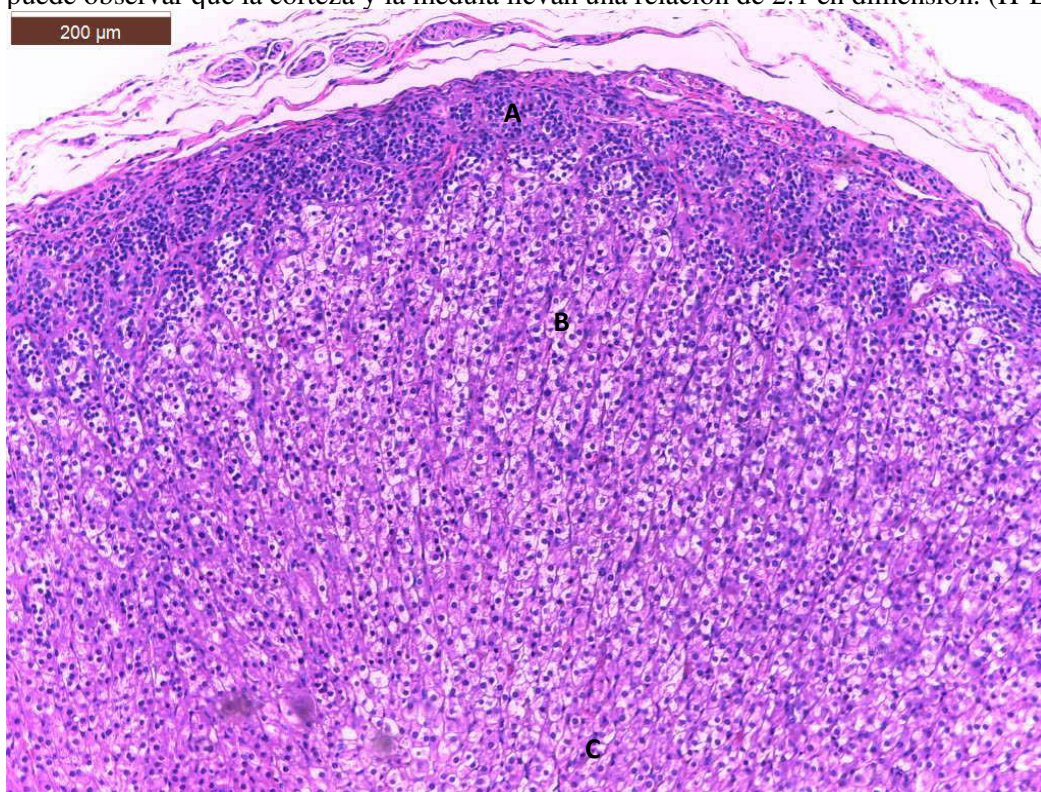


Figura 7. Corteza adrenal en cría de alpaca de una semana de edad. Se evidencia las tres zonas corticales: A. Zona glomerular. B. Zona fasciculada. C. Zona reticular. (H-E 10X)

A los 15 días de edad de la alpaca, la corteza adrenal se muestra más ancha, encontrándose que la zona fasciculada es la más desarrollada de las tres zonas de la corteza adrenal (Figura 8). La médula se va ensanchando en el polo caudal de la glándula adrenal mostrando vasos sanguíneos en su interior.

La cápsula se va engrosando y en la adventicia se pueden observar arteriolas de distintos calibres. Emite proyecciones de tejido conectivo hacia la zona glomerular formando acinos y algunas de estas proyecciones pueden llegar hasta la región corticomedular. Los acinos de la zona glomerular muestran células aglomeradas con núcleos muy basófilos (Figura 9).

La zona fasciculada está septada por fino tejido conectivo de células fusiformes que se distribuyen alrededor de células que forman cordones pero de manera discontinua hasta llegar a la zona reticular. Las células se caracterizan por tener núcleos centrales, ovoides, fuertemente basófilos, con citoplasma abundante y espumoso (Figura 10)

La zona reticular presenta células más acidófilas de forma irregular con núcleo basófilo, que se van entremezclando con las células de la médula adrenal. (Figura 11).

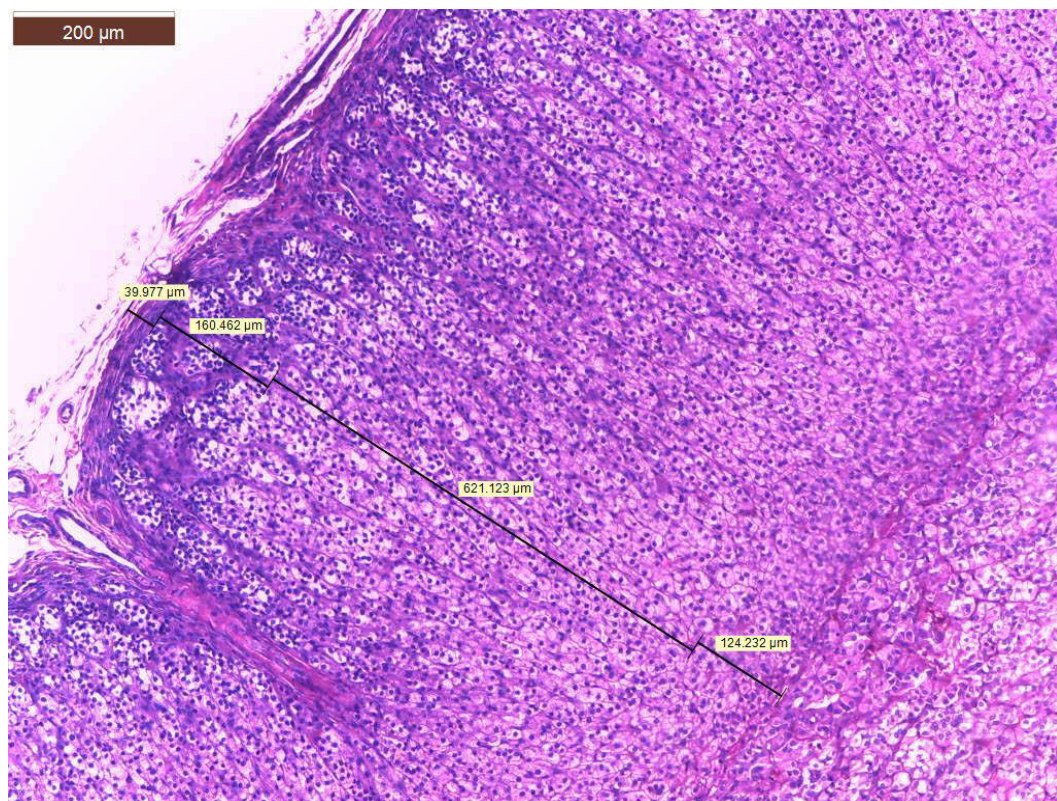


Figura 8. Corteza adrenal de cría de alpaca de 15 días de edad. La zona fasciculada es la más desarrollada de las zonas corticales. (H-E 10X)

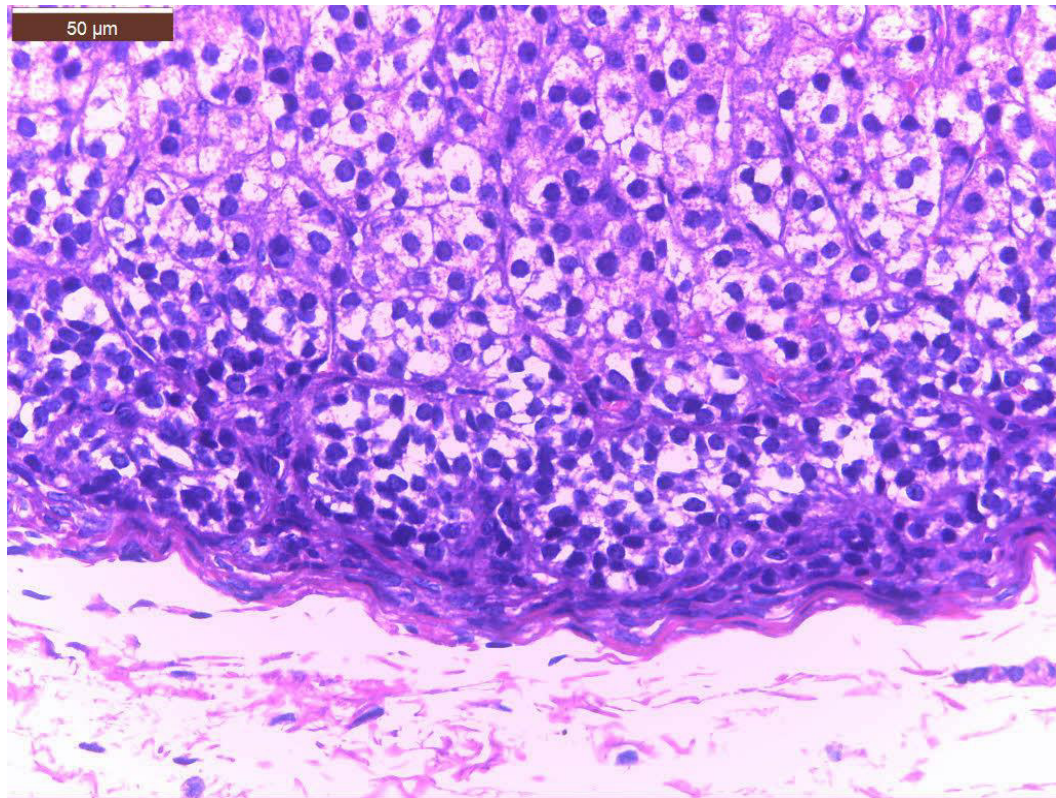


Figura 9. Zona glomerular de la corteza adrenal de cría de alpaca de 15 días de edad. (H-E 40X).

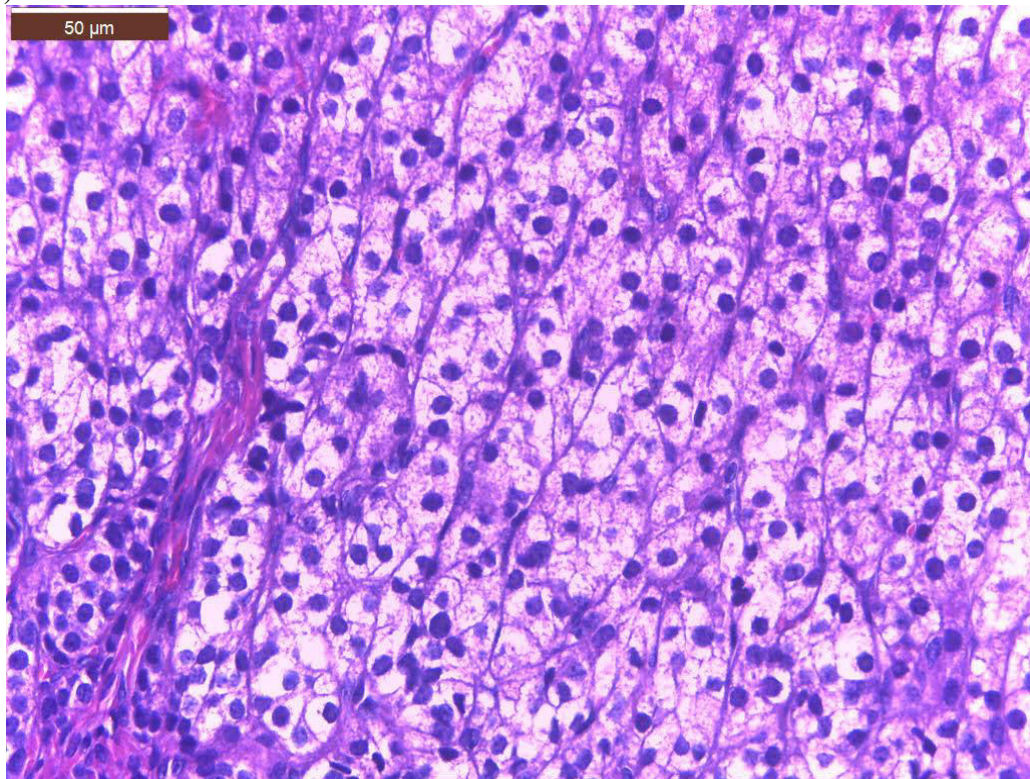


Figura 10. Zona fasciculada de la corteza adrenal de cría de alpaca de 15 días de edad. Se muestra la disposición celular a manera de cordones. (H-E 40X)

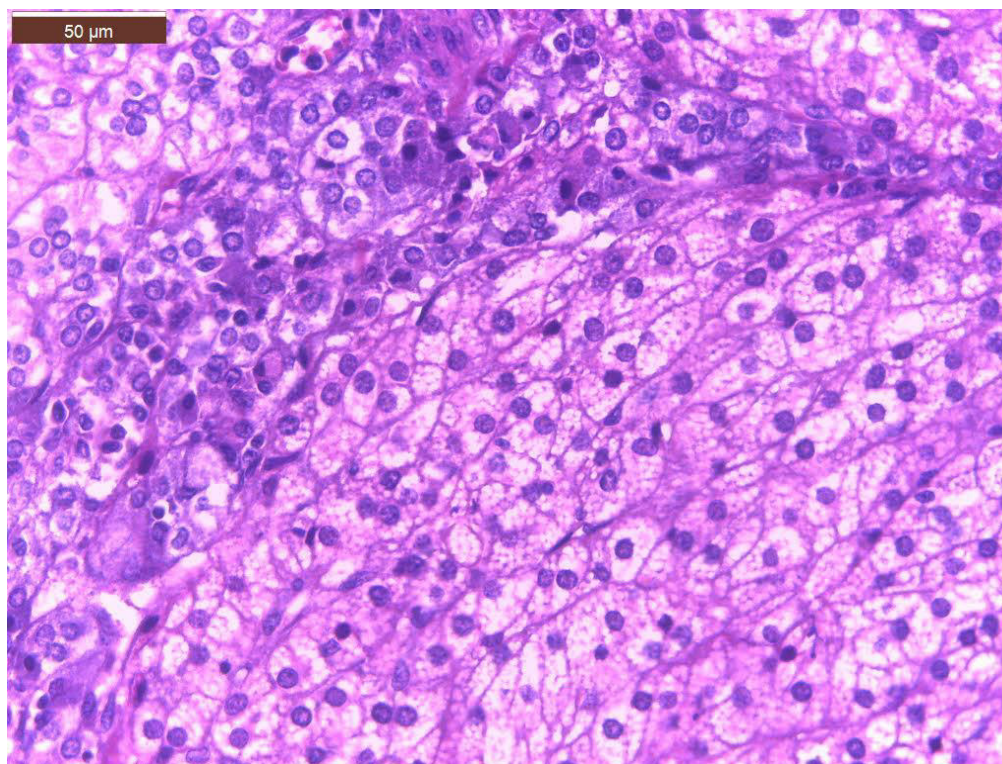


Figura 11. Zona reticular de la corteza adrenal de cría de alpaca de 15 días de edad. Se muestra la disposición celular a manera de red. (H-E 40X)

A los 21 días de edad de la alpaca, presenta una cápsula más desarrollada y engrosada, manteniendo en la corteza adrenal una zona más desarrollada que es la zona fasciculada. La zona reticular se entremezcla con la médula adrenal (Figura 12).

La zona glomerular manifiesta células más grandes con núcleos muy basófilos y hacia los polos de las células. Las células de esta zona se observan que están rodeados por tabiques que provienen desde la cápsula (Figura 13), así mismo las células de la zona fasciculada se ven más grandes con citoplasma espumoso y núcleo bastante basófilo manteniéndose los tabiques capsulares que ingresan hasta el interior de la glándula (Figura 14).

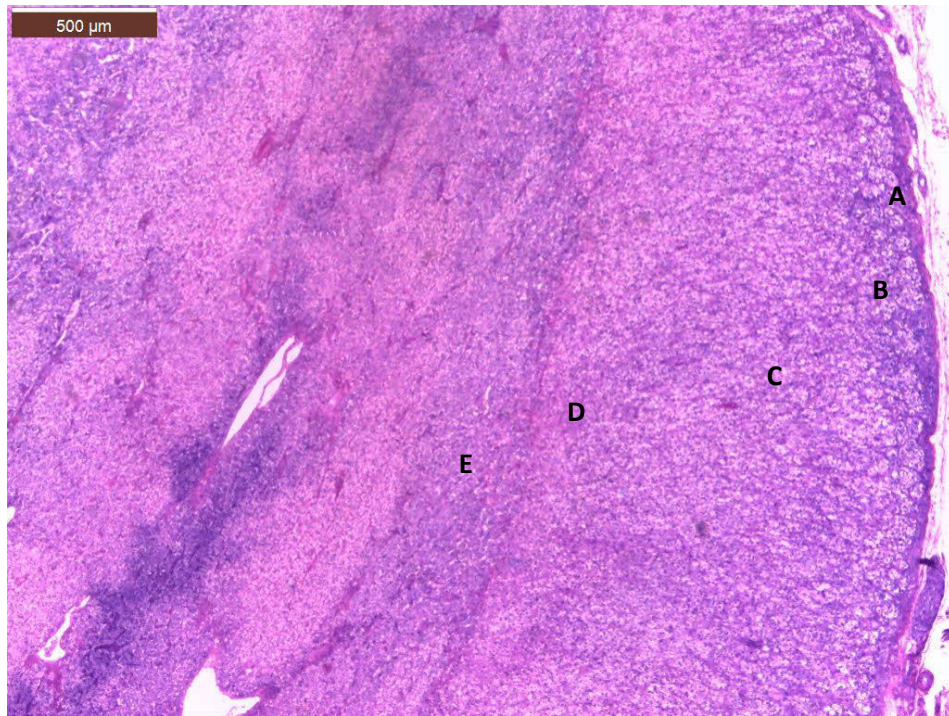


Figura 12. Corteza adrenal de cría de alpaca de 21 días de edad. A. Cápsula engrosada. B. Zona glomerular. C. Zona fasciculada. D. Zona reticular. E. Médula adrenal (H-E 5X)

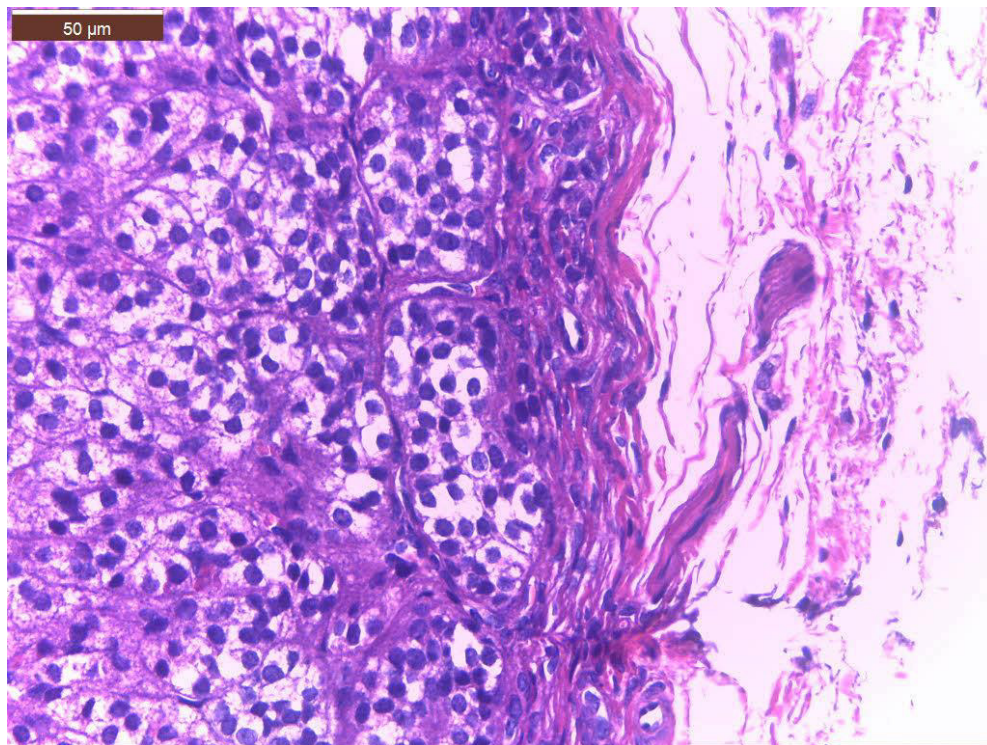


Figura 13. Cápsula engrosada y zona glomerular de la corteza adrenal en cría de alpaca de 21 días de edad. (H-E 40X)

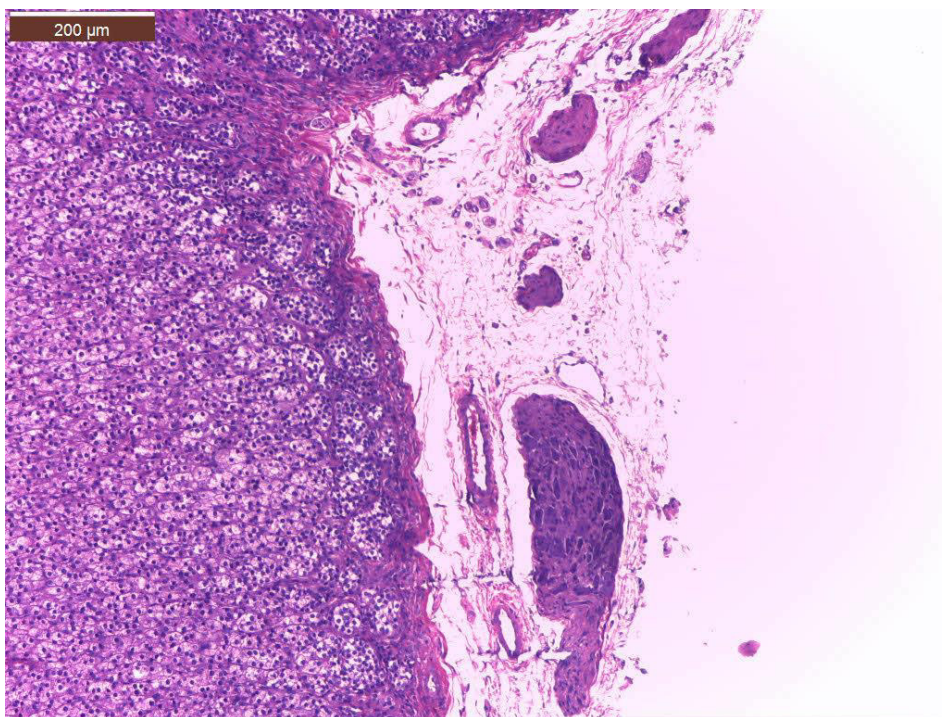


Figura 14. Cápsula engrosada que desprenden tabiques al interior de la corteza adrenal en cría de alpaca de 21 días de edad. (H-E 10X)

Al mes de edad de la alpaca, la cápsula se visualiza más engrosada y la zona glomerular se muestra más definida (figura 15), presenta hasta dos filas de acinos glandulares cuyas células son más globosas, citoplasma más abundante, siempre con el núcleo más basófilo y más grande que de la zona fasciculada (Figura 16).

La zona fasciculada se muestra como cordones de células hinchadas, pero los cordones se muestran más acortados a diferencia de las crías de 15 días, haciéndose más gruesa la capa reticular (Figura 17)

La zona reticular se visualiza más engrosada, con las células más hinchadas, citoplasma más vacuolado, núcleos más pequeños en comparación a las otras zonas, las células son hasta cinco veces más grandes que el núcleo (Figura 18).

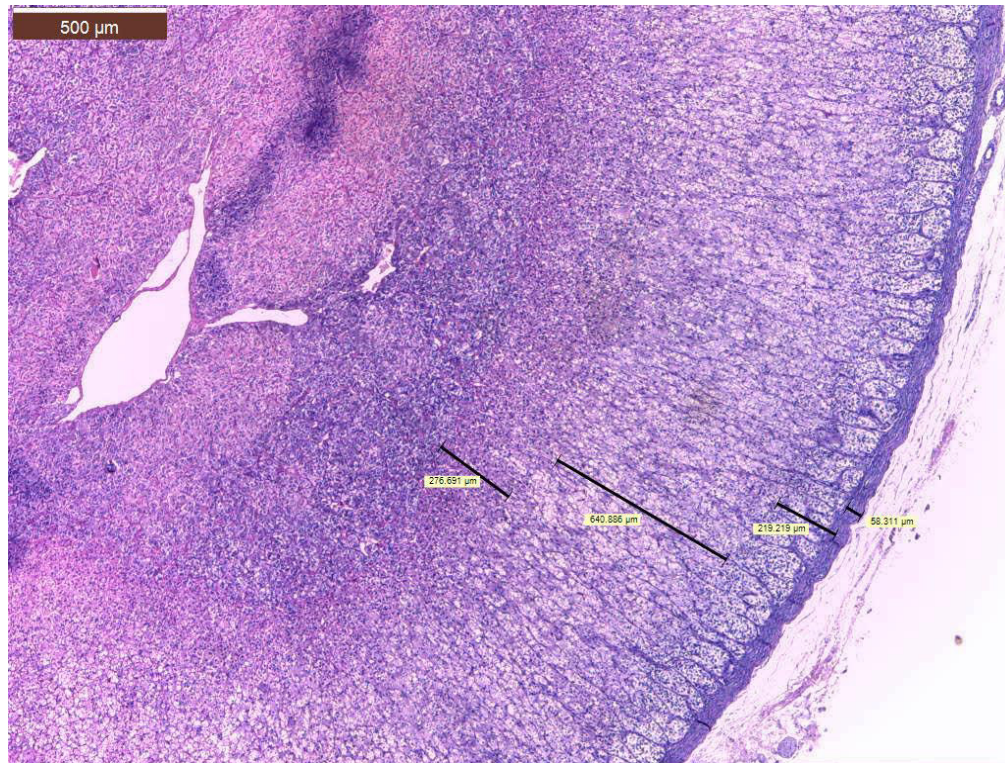


Figura 15. Corteza adrenal de cría de 1 mes de edad. La zona fasciculada sigue siendo la de mayor tamaño, mientras que la zona reticular se engrosa y pasa a ser la segunda en tamaño. (H-E 5X)

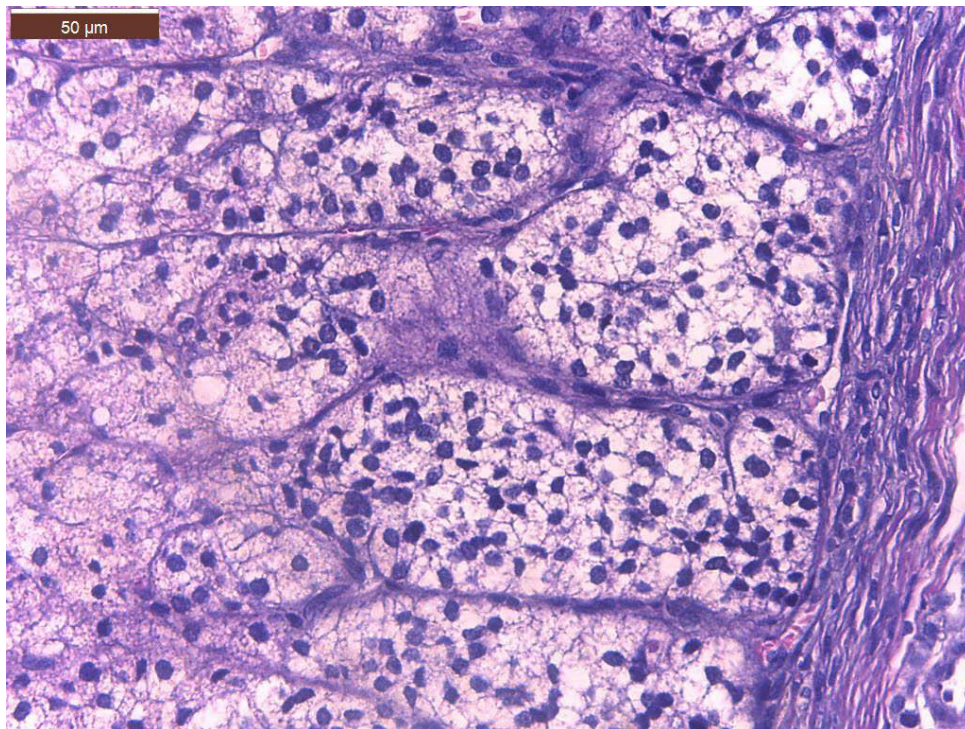


Figura 16. Zona glomerular de la corteza adrenal de cría de 1 mes de edad (H-E 40X)

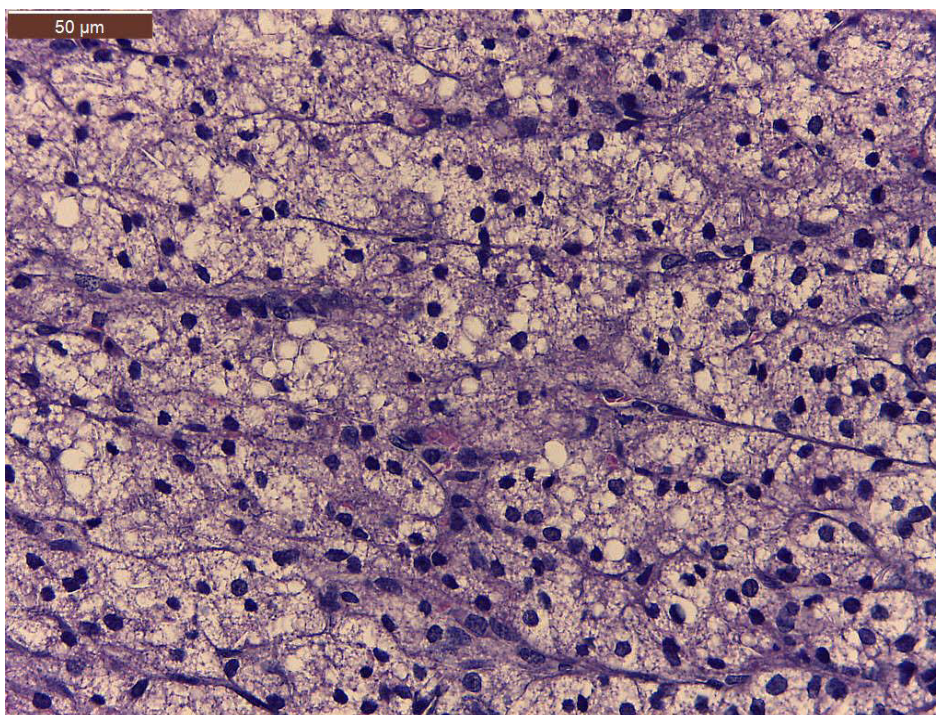


Figura 17. Zona fasciculada de la corteza adrenal de cría de 1 mes de edad (H-E 40X).

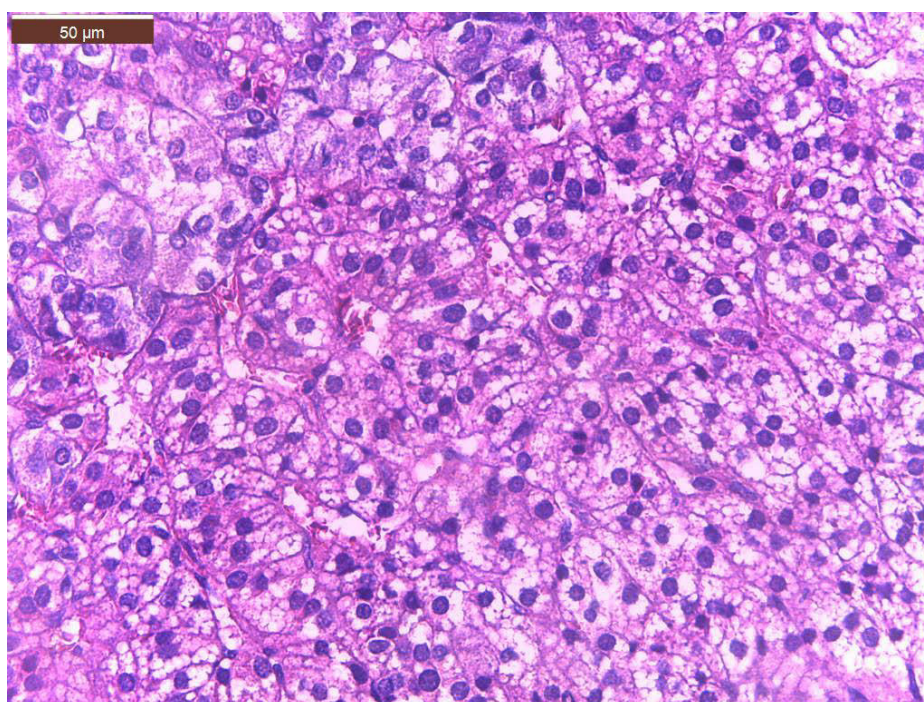


Figura 18. Zona reticular de la corteza adrenal de cría de 1 mes de edad (H-E 40X).

A los 45 días de edad de la alpaca, se observa una cápsula de tejido conectivo delgado, fibras musculares, múltiples vasos sanguíneos, a diferencia de la cápsula de la glándula adrenal del perro que es mucho más gruesa. Áreas equidistantes con numerosas arteriolas. Se encuentra cubierto por un discreto panículo adiposo con aponeurosis musculares y varios nervios. El endotelio de las arteriolas se proyecta a la luz. De la cápsula se emite un tejido conectivo muy fino como trabéculas (Figura 19) que encapsula a un grupo de células poliédricas con núcleo central y citoplasma espumoso claro formando islas de diferentes tamaños que viene a ser la zona glomerular, septan ésta zona y la fasciculada llegando a confundirse en la zona reticular.

La relación de corteza y médula se convierte en casi 1:1. (Figura 20). La corteza se define mejor en las tres zonas corticales: glomerular, fasciculada y reticular (Figura 21).

La zona glomerular es subcapsular, con múltiples células de citoplasma bastante espumoso claro que se aglomeran, agrupadas y separadas por tejido conectivo muy fino. El núcleo de estas células es central y basófilo.

La zona fasciculada, presenta el mismo grupo celular que en las otras edades pero de manera más ordenada y se disponen a manera de cordones y las trabéculas son mucho más delgadas y radiadas hacia la médula.

La zona reticular presenta células más poliédricas y más basófilas (Figura 22), se encuentran de manera más desordenada, colindante a la médula. Presentan un fino puntilleo basófilo en el citoplasma. En tamaño pasa a ser la segunda de las tres zonas corticales, y casi similar a la zona fasciculada (Figura 23).

La médula presenta células cúbicas a poliédricas que tiñen menos intensamente, citoplasma acidófilo no espumoso, núcleo más claro basófilo. Las células tienen apariencia de hepatocitos. Presenta mayor irrigación con arteriolas y vénulas.

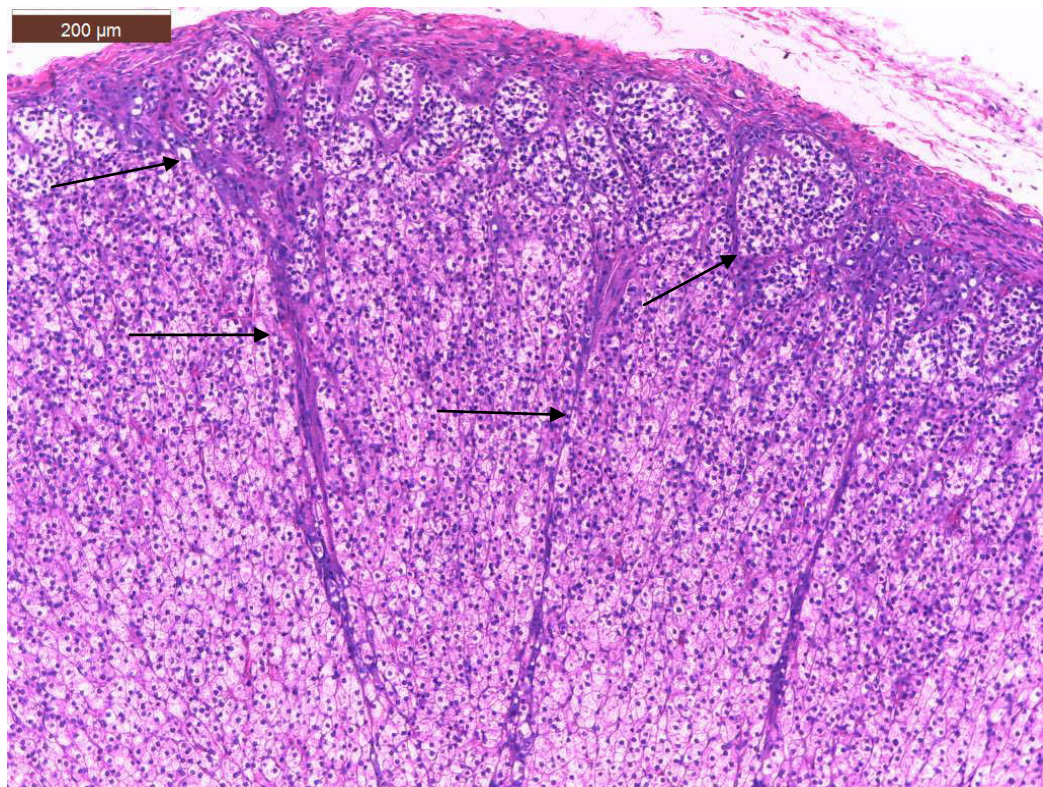


Figura 19. Tabiques capsulares que septan la corteza adrenal de cría de alpaca de 45 días de edad. (H-E 10X).

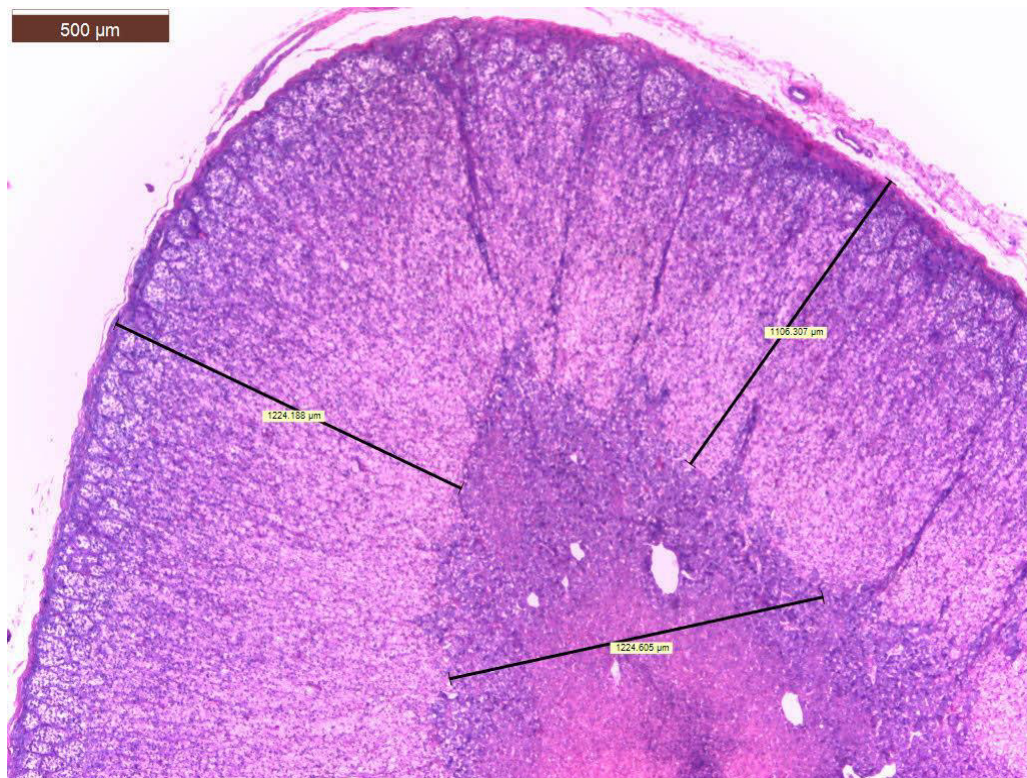


Figura 20. Relación corteza y médula adrenal de cría de alpaca de 45 días de edad (H-E 5X).

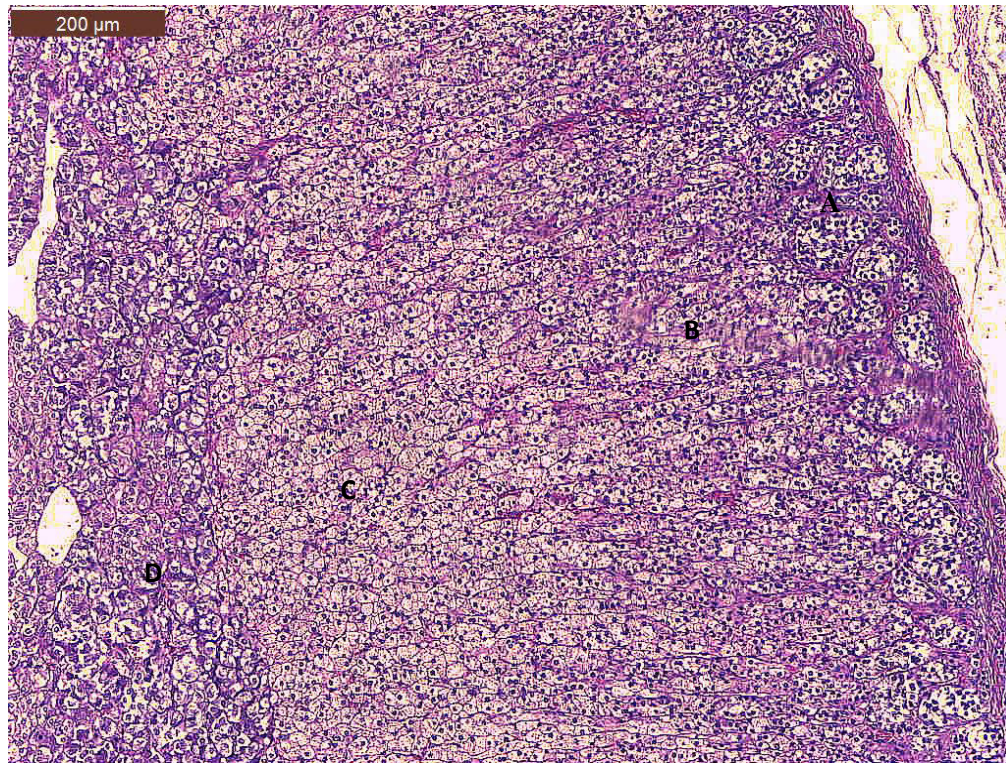


Figura 21. Zonas cortico- adrenales y médula adrenal de cría de alpaca de 45 días de edad. A. Zona glomerular. B. Zona fasciculada. C. Zona reticular. D. Médula adrenal (H-E 10X)

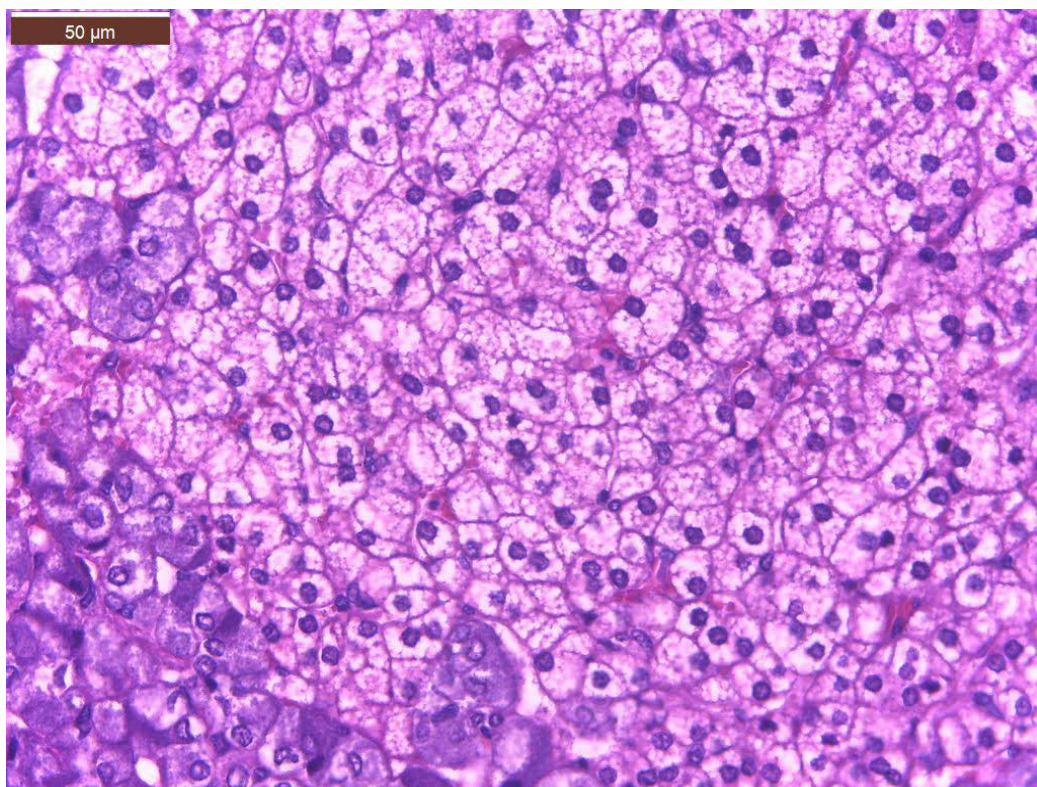


Figura 22. Zona reticular de la corteza adrenal de cría de alpaca de 45 días de edad. (H-E 40X).

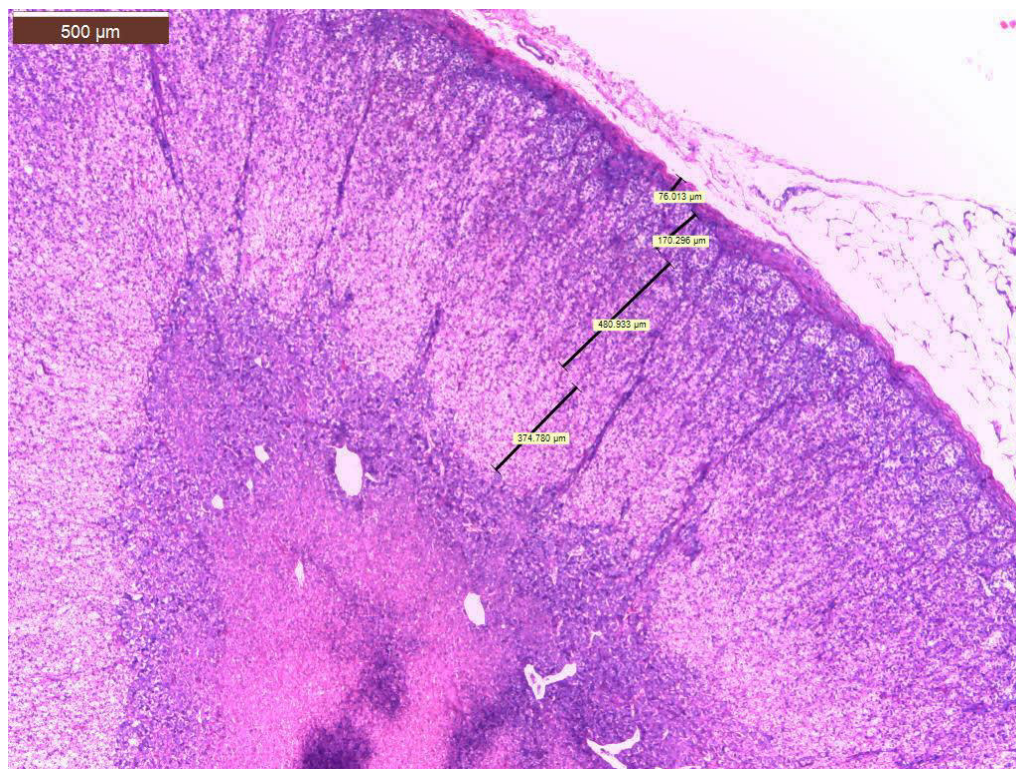


Figura 23. Corteza adrenal de cría de alpaca de 45 días de edad. La zona fasciculada y la zona reticular son casi del mismo tamaño por engrosamiento de la zona reticular. (H-E 5X)

La cápsula de la glándula adrenal de crías de alpaca fue de tejido conectivo denso que rodeó a la glándula y originó tabiques al interior de ésta. La corteza de la glándula presentó tres zonas concéntricas de límites no siempre bien definidos con diferente disposición y aspecto celular semejante a lo descrito por Montalvo, 1977.

La corteza adrenal fue más desarrollada que la médula adrenal, caso contrario encontró El-Nahla *et al.*, 2011 durante la vida prenatal del camello, donde la médula suprarrenal era mucho más gruesa que la corteza.

Webb (1980) describió que en fetos de cordero existe un rápido desarrollo de las células diferenciadas funcionalmente de la zona fasciculada en los últimos días de gestación. Webb y Steven (1981) describieron que en fetos de potros también hay un rápido aumento en la diferenciación funcional de las células de la zona fasciculada entre 300 días y el nacimiento, lo cual corroboramos en este estudio pues ya en la cría de alpaca de 7 días de edad se encontró un desarrollo marcado de esta zona, tomando en cuenta que el tiempo de gestación es muy similar entre equinos y alpacas.

Abdalla y Ali (1988) estudiaron las glándulas adrenales de camellos, encontrando que la corteza adrenal formó 74% del volumen de la glándula y la proporción de la corteza de la médula es de 4:1. La zona glomerular, fasciculada y reticular constituyeron aproximadamente el 13%, 53%, y 29% en volumen de la corteza, respectivamente. En este estudio en crías de alpacas, encontramos que la zona glomerular, fasciculada y reticular constituyeron 15%, 55% y 30% en tamaño de la corteza adrenal, respectivamente; sin embargo la proporción de la corteza adrenal y médula adrenal se mantuvo semejante a lo encontrado en camellos.

Nabipour *et al.*, (2008) describe la histología de las glándulas adrenales del camello adulto evidenciando una cápsula de tejido conectivo denso, así como trabéculas que se originan en la cápsula y penetran en la corteza. La zona glomerular formada por células en racimos, mientras que la zona fasciculada consiste de células dispuestas en cordones de manera radiada, siendo las células de la parte superior más espumosas; la zona reticular fue más pequeña y oscura que la zona fasciculada. Esta descripción se asemeja a lo encontrado en el presente trabajo sobretodo en crías de alpaca hasta el mes de edad, ya que luego la zona reticular se va engrosando.

La irrigación sanguínea de la glándula adrenal se dio por arterias que ingresaron en diferentes partes de la superficie de la glándula tal como lo describe Montalvo, 1977 en alpacas adultas. Así las ramas de estas arterias formaron un plexo subcapsular como sucede en las especies mamíferas, y luego emergen tres grupos de vasos arteriales: las arterias de la cápsula; las arterias de la corteza, que se ramificaron en toda la glándula y formaron capilares sanguíneos que drenaron en los vasos capilares de la médula; y las arterias de la médula, que atravesaron la corteza para ramificarse en muchos capilares de la médula. Los capilares de la médula junto con los vasos sanguíneos que irrigaron la corteza formaron las venas medulares que se unieron para constituir la vena adrenal.

Estudio inmunohistoquímico de la glándula adrenal en crías de alpaca

“Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular. La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares permite la localización microanatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad

del estudio y proporcionando información adicional esencial en muchos casos” (Gimeno y Massone, 1998; Yang *et al.*, 2011)

Células productoras de cortisol:

Empleando un anticuerpo monoclonal anti 11 Beta hidroxilasa que es específico para células productoras de corticoides se determinó la presencia de las células productoras de cortisol mediante una marcación fuerte (grado 2) principalmente en la zona fasciculada de la corteza adrenal; sin embargo, también hubo reacción positiva aunque con una marcación leve (grado 1) en células de la zona reticular. La zona glomerular no reaccionó a la tinción inmunohistoquímica, principalmente porque esta zona cortical se encarga de producir aldosterona y no cortisol (Figura 24)

La reacción inmunohistoquímica fue mucho más marcada en glándulas adrenales de crías de alpaca mayores al mes de edad, indicando una reacción fuerte por mayor producción de cortisol. Asimismo estas células productoras de cortisol fueron de mayor medida en crías de alpaca mayores al mes de edad. (Figura 25).



Figura 24. Marcación positiva a células productoras de cortisol en la zona fasciculada-reticular mediante IHQ en cría de alpaca de 1 mes de edad. (IHQ-5X)

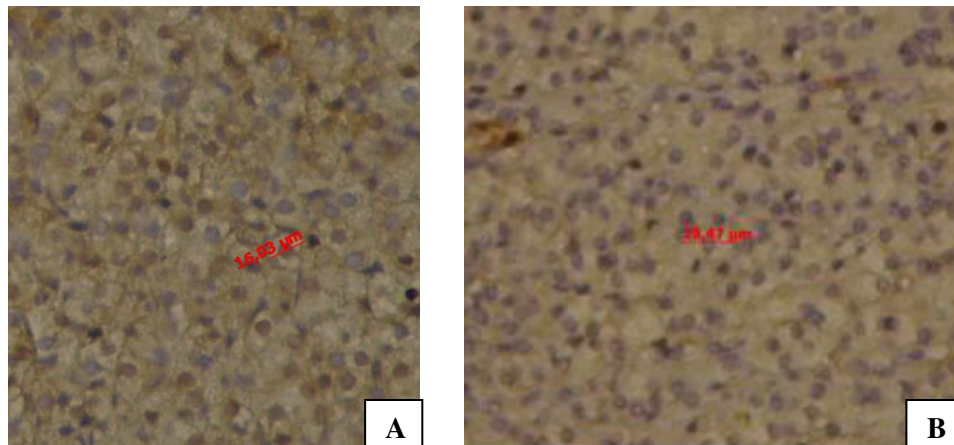


Figura 25. Células productoras de cortisol en zona fasciculada de la corteza adrenal en crías de alpaca marcadas con IHQ. A. Células de la zona fasciculada en cría de alpaca de 15 días de edad. B. Células de la zona fasciculada en cría de alpaca de 45 días de edad. (IHQ- 40X)

Ishimura y Fujita (1997) indicaron que estudios inmunohistoquímicos pusieron de manifiesto la localización precisa de las enzimas implicadas en la esteroidogénesis adrenal, demostraron que los citocromos P450 de la enzima colesterol escisión de la cadena lateral (P450scc) y de 11 beta-hidroxilasa (P45011 beta), 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa / isomerasa delta 5-4 (3 beta HSD), y 21 hidroxilasa-(P450c21) se localizan en todas las células de la corteza suprarrenal, especialmente en los de la zona fasciculada-reticular, tal como lo encontrado en este estudio en crías de alpaca.

Barber y Ponz (2000) menciona que “el cortisol, mediante su unión a receptores específicos intracelulares, inhibe en el hipotálamo la síntesis y liberación de la hormona hipotalámica liberadora de corticotropina (CRH), por lo que disminuye la respuesta de las células corticotropas hipofisiarias a la CRH y bloquea en estas mismas células la secreción de ACTH”.

Después de un evento estresante, como el parto o el destete en crías de alpaca (Bravo *et al.*, 2001), el sistema nervioso va estimular a un grupo de neuronas hipofisiotrópicas que se ubican en el hipotálamo, para liberar en la circulación portal la CRH y arginina-vasopresina, las cuales a su vez estimulan la liberación de ACTH en la circulación sanguínea, y en respuesta a la ACTH, la corteza adrenal va a producir glucocorticoides, ya sea cortisol o corticosterona (Herman *et al.*, 2003) siendo el cortisol un indicador de estrés en alpacas y llamas (Arias y Velapatiño, 2015)

Receptores de ACTH

Empleándose un anticuerpo policlonal Anti-Melanocortin Receptor 2 (Gantz y Fong, 2003) se ubicaron las células receptoras de ACTH en la glándula adrenal de las alpacas crías, ubicándose principalmente en la zona glomerular con una marcación fuerte (grado 2), mientras que en la zona fasciculada y reticular hubo marcación de forma leve (grado 1) (Figura 26), la cual fue más intensa en alpacas hasta la segunda semana de edad, para luego mantenerse la marcación en grado 1 en todas las zonas corticoadrenales (Figura 27).

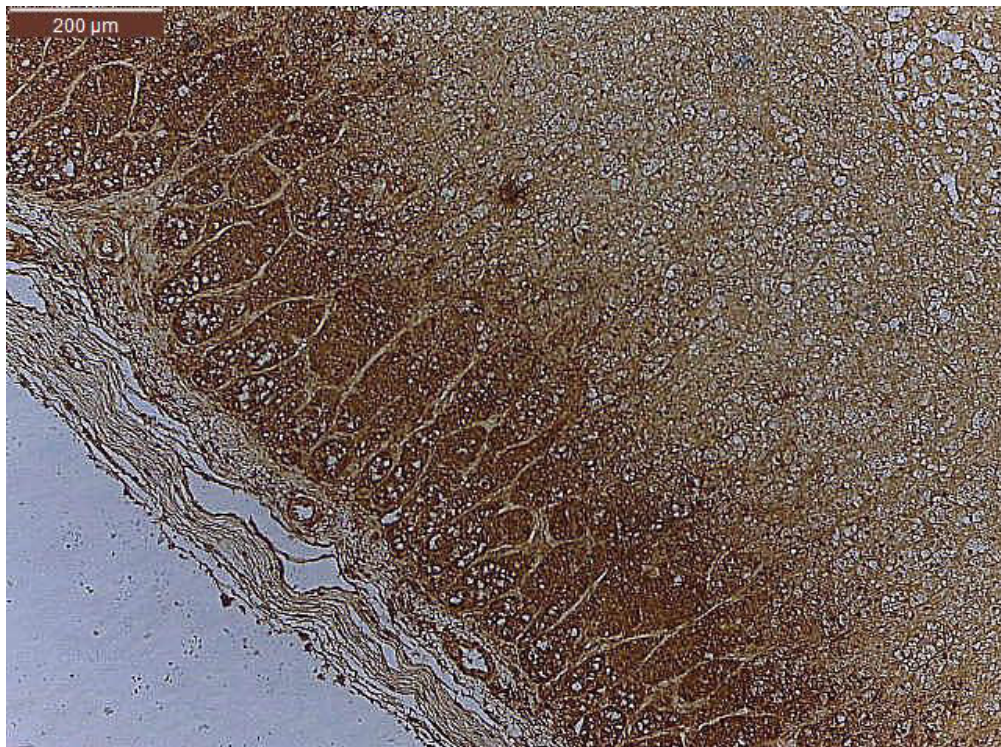


Figura 26. Marcación positiva a células receptoras de ACTH en la corteza adrenal mediante IHQ en cría de alpaca de 1 mes de edad. (IHQ-10X). Se puede observar marcación grado 2 en la zona glomerular y marcación grado 1 en las zonas fasciculada y reticular.

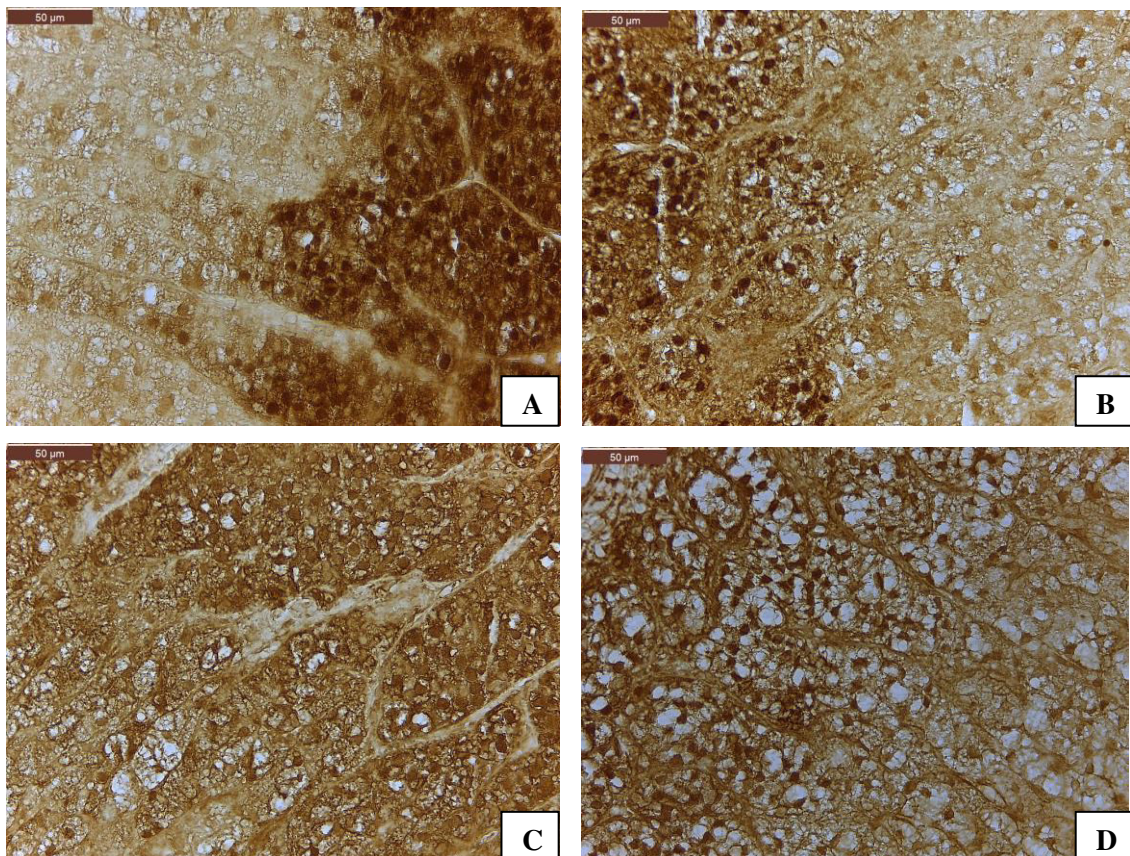


Figura 27. Células receptoras a ACTH en corteza adrenal de crías de alpaca. A. Marcación en grado 2 en la zona glomerular y grado 1 en zona fasciculada en cría de alpaca de 1 semana de edad. B. Marcación en grado 2 en la zona glomerular y grado 1 en zona fasciculada en cría de alpaca de dos semanas de edad. C. Marcación en grado 1 en ambas zonas corticales en crías de alpaca de un mes de edad. D. Marcación en grado 1 en ambas zonas corticales en crías de alpaca de 45 días de edad. (IHQ-40X).

En nuestro estudio tuvimos marcación a receptores de ACTH en dos de las zonas corticales: glomerular y fasciculada. La zona glomerular presentó células con actividad fuerte de producción del principal mineralocorticoide, que es la aldosterona. Pero además, la corteza adrenal también produce desoxicorticosterona y corticosterona, sin embargo el cortisol, que es el principal glucocorticoide, también presenta una cierta actividad mineralocorticoide. “La aldosterona tiene como células blanco las células del epitelio tubular renal, y su principal función consiste en estimular la reabsorción de sodio y la excreción de potasio. Este mismo efecto también lo realiza en las glándulas sudoríparas, salivales y en el tracto gastrointestinal. El hecho de que un elevado porcentaje de aldosterona circule en forma libre permite la rápida acción de esta hormona cuando debe hacer correcciones vitales del potasio sanguíneo, pues, de otro modo la vida del animal se vería comprometida. La regulación de la secreción de aldosterona no responde al clásico mecanismo de retroalimentación negativa y se ve poco

influida por los niveles de ACTH. En su lugar, la liberación de aldosterona por las células de la corteza adrenal responde a las variaciones en los niveles plasmáticos de potasio y de sodio, directamente relacionadas con los cambios en la presión sanguínea, la volemia o la presión osmótica” (Ruiz *et al.*, 2008).

“El eje HPA (hipotálamo-hipófisis-adrenal) tiene una importancia fisiopatológica en la respuesta al estrés, siendo innumerables los estudios que se han desarrollado para su investigación y esclarecer por qué los glucocorticoides parecen ser esenciales para la supervivencia en muchas situaciones de estrés. La liberación rápida de la ACTH alcanza a las glándulas adrenales donde estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides. La liberación de glucocorticoides está regulada por los mecanismos de retro inhibición del eje HPA que actúan a nivel de hipófisis, hipotálamo e hipocampo, inhibiendo así su propia secreción” (Johnson *et al.*, 1992).

Elias y Clark (2000) nos indican que “la ACTH estimula la secreción y síntesis adrenal de glucocorticoides, actuando mediante su interacción con un receptor específico de membrana. La secreción de glucocorticoides suprarrenales está regulada pues por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que actúa a través de un receptor específico de membrana celular (ACTH-R). La ACTH-R es un miembro de la superfamilia de la proteína G acoplada a receptores y pertenece a la subfamilia de melanocortina receptores. La ACTH-R se expresa principalmente en las células adrenocorticales que muestra una especificidad tisular restringida, aunque se reconoce ACTH por los otros cuatro receptores de melanocortina”, quizás sea la razón por la que en nuestro estudio en crías de alpaca se haya tenido marcación fuerte en la zona glomerular pero las otras zonas corticales también presentaron marcación.

Dal Zotto (2002) indica que “estos receptores se conocen con el nombre de receptores de melanocortinas (MCR), de los cuales se han clonado y caracterizado cinco subtipos hasta el presente. El receptor para la ACTH (ACTH-R) pertenece al subtipo MCR-2, el cual es activado selectivamente por la ACTH y es expresado principalmente en las células adrenocorticales, tal cual encontramos en nuestro estudio donde la zona marcada con grado fuerte para receptores de ACTH fue la zona glomerular, seguida de la zona fasciculada y reticular, especialmente en crías de alpacas menores del mes de edad.. Este receptor sigue un patrón de regulación semejante a los de otros sistemas endocrinos: así, cuando las concentraciones de ACTH son elevadas, el número y la sensibilidad de los receptores disminuye”.

“Los glucocorticoides, al igual que la ACTH, no se secretan de modo continuo, sino que lo hacen de manera episódica. Su secreción es intermitente durante cortos períodos de tiempo (minutos) y la separación entre los picos puede durar incluso horas. El número y duración de los picos secretorios varía a lo largo del día, teniendo un máximo entre las 4 y 8 h de la mañana y un mínimo entre las 8 y 12 h de la noche para el hombre. Estos cambios en la frecuencia y amplitud de la secreción son los que dan lugar al ritmo circadiano, que varían en función de los ritmos de actividad del individuo. En los roedores que tienen hábitos nocturnos, la mayor secreción de glucocorticoide ocurre durante la noche, coincidiendo con la ingesta de alimentos sólidos. En la rata, la secreción de corticosterona presenta niveles bajos durante el día (basales), comenzando a incrementar por la tarde y presentando su pico de secreción justo antes del anochecer que es cuando inician su mayor actividad” (Dal Zotto, 2002)

Cortisol de crías de alpaca

Los valores promedio de cortisol en las crías estudiadas fue de 1.203ug/dl con DS de 0.632, la cría de menor edad tenía una semana de nacida quien tuvo 0.719ug/dl de cortisol en suero; la cría de mayor edad tenía 45 días de edad quien tuvo 2.331ug/dl de cortisol en suero, siendo a la edad de 21 días que se superó el 1ug/dl.

Nuestros resultados fueron significativamente más bajos que los encontrados por Bravo *et al.*, (2001), quien evaluó el cortisol en alpacas recién nacidas, encontrando el día del parto valores de cortisol de 12.58ug/dl y luego disminuyó a 2.72ug/dl a los 3 días después del nacimiento; 2 días antes del destete el cortisol era de 3.25ug/dl y luego aumentó al día 3 a 6.47ug/dl y luego disminuir a 2.94ug/dl en el día 5 después del destete.

Los valores de cortisol en suero para las crías de alpaca recién nacidas encontrados en nuestro estudio coincidieron con los valores reportados por Ríos *et al.*, (2003) en crías de guanaco al nacimiento criados en cautiverio, quienes reportaron 0.74ug/dl, las cuales fueron muestreadas entre las 9am y 11am. Así mismo halló hacia el mes de edad un promedio de valores de cortisol de 0.83ug/dl con un error de 0.08, lo cual lo asemeja a nuestro estudio, ya que a partir de los 21 días de edad ya alcanzaban el 1ug/dl de cortisol en suero.

Los valores hallados cercanos al mes y medio de edad en crías de alpaca también se asemejaron a los hallados por Coppo (2004) en suero de terneros de cruce cebú de dos meses

próximos al destete muestreados en la mañana, estos valores fueron de $2,4 \pm 0,6 \mu\text{g/dl}$. Las hembras tuvieron menores valores de cortisol en suero que los machos.

La secreción de cortisol sigue de ordinario la pauta de secreción de ACTH, salvo en situaciones de estrés, los valores medios de cortisol en sangre se mantienen con oscilación circadiana dentro de ciertos límites normales, debido a un control por retroacción negativa (Barber y Ponz, 2000)

Como se sabe existe un ritmo circadiano de secreción de esteroides de manera fisiológica lo cual puede conllevar a diferentes valores de cortisol en sangre, ya que se eleva a las horas del inicio del sueño, llegando a su más alto valor al despertar y descende durante la mañana, siendo muy bajos al atardecer y en la noche. Sin embargo como describe Dal Zotto (2002) este ritmo espontáneo de liberación de cortisol puede ser interrumpido bruscamente por un estrés fisiológico o daño físico o de manejo, vía sistema nervioso central, ya que a veces se requiere una concentración aumentada de cortisol para que el cuerpo se recupere del estrés.

V. CONCLUSIONES

- En el estudio anatómico, la ubicación de la glándula adrenal derecha de las crías de alpaca fue ventral a la altura del cuerpo de la 12va. vértebra torácica mientras que la glándula adrenal izquierda se ubicó ventral a la altura del cuerpo de la 3era. vértebra lumbar. La glándula adrenal derecha es igual o más grande que la izquierda hasta el mes de edad de las crías de alpaca. La glándula adrenal del lado izquierdo es más grande y de un mayor peso que del lado derecho a partir del mes de edad, similar al patrón morfológico con las otras especies domésticas.
- En el estudio histológico, la glándula adrenal presentó una cápsula, una corteza adrenal con tres zonas corticales: glomerular, fasciculada y reticular, y una médula adrenal. La corteza es más desarrollada que la médula adrenal, siendo la zona fasciculada la más grande de las tres zonas corticales. Conforme avanza en edad la cría de alpaca, la zona reticular se convierte en la segunda zona en tamaño.
- En el estudio inmunohistoquímico, las células productoras de cortisol se ubicaron de preferencia en la zona fasciculada de la glándula adrenal, sin embargo también hay reacción positiva por IHQ en la zona reticular aunque muy leve. Esta reacción es más notoria en crías de alpaca mayores de 1 mes de edad. Mientras que las células receptoras de ACTH se ubicaron en toda la corteza adrenal preferentemente en la zona glomerular.
- Los valores promedio de cortisol en las crías estudiadas fue de 1.203ug/dl con DS de 0.632, siendo a la edad de 21 días que se superó el 1ug/dl.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios morfológicos e inmunohistoquímico en glándulas adrenales de alpacas de diferentes edades y considerando el sexo, para tener un mayor conocimiento de la funcionabilidad de ésta glándula y el manejo del estrés.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Abdalla MA; AM Ali. 1988.** Morphometric and histological studies on the adrenal glands of the camel (*Camelus dromedaries*). *Acta Morphol Neerl Scand.* 1988-1989; 26(4):269-81.
2. **Akers RM, Denbow DM. 2013.** Anatomy and physiology of domestic animals. Chapter 12: Endocrine system. John Wiley & Sons, Inc. Second Edition. Pp 357-360.
3. **Álvarez R. 2007.** Manifestaciones del estrés. Disponible en: <http://www.etologiaveterinaria.net/Articulos.htm#inicio>
4. **Ameghino E, De Martini J. 1991.** Mortalidad de crías en alpacas. Centro de Investigación Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. Lima. 128 p.
5. **Arias N, Velapatiño B. 2015.** Cortisol como Indicador Fiable del Estrés en Alpacas y Llamas. *Rev Inv Vet Perú* 2015; 26(1): 1-8.
6. **Barber A, Ponz F. 2000.** Principios de fisiología animal. Editorial Síntesis S.A. Madrid, España. Pp 354-366.
7. **Bravo PW, J Garnica, E Aviles. 2001.** Cortisol concentrations in the perinatal and weaning periods of alpacas. *Anim Reprod Sci.* 2001 Jul 3; 67 (1-2):125-9.
8. **Climent S, Sarasa M, Muniesa P, Latorre R. 2005.** Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos - Conceptos básicos y datos aplicativos. Capítulo 17: Glándulas suprarrenales o adrenales. 1ª ed. Zaragoza: Acribia SA. Pp 265-269.
9. **CONCYTEC. 2006.** Programa Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación en Camélidos Sudamericanos. Lima. 64 pp.
10. **Coppo JA. 2004.** El destete precoz del ternero causaría alarma simpática meduloadrenal en lugar de estrés corticoadrenal. *InVet.* 2004, 6(1): 11-20.

11. **Dal Zotto S. 2002.** Efectos a largo plazo de una sola exposición al estrés: relación con la adaptación al estrés crónico y factores implicados. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 150 pp.
12. **Dantzer R, P Morméde, RM Bluthé, J Soissons. 1993.** The effect of different conditions on behavioural and adrenocortical reactions in veal calves. *Reproduction Nutrition Develop.* 23: 67-74.
13. **Domínguez M, A Castro, S Gómez, G Mendoza, C Llerena, M Ghezzi, C Barbeito. 2012.** Características morfológicas de las glándulas adrenales en llama (*Lama glama*). Resumen VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. Arica, Chile.
14. **Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. 2003.** Textbook of Veterinary Anatomy. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders. 864p.
15. **Elias LLK; Clark AJL. 2000.** The expression of the ACTH receptor. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2000) 33: 1245-1248.
16. **El-Nahla SM, Imam HM, Moussa EA, Elsayed AK, Abbott LC. 2011.** Prenatal Development of the Adrenal Gland in the One Humped Camel (*Camelus dromedarius*). *Anat Histol Embryol.* 2011 Jun; 40(3):169-86.
17. **FAO. 2005.** Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Publicación de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Junio 2005. 62p.
18. **Faulkin LJ; I Schmidt, W Tyler. 1967.** Lecture Syllabus for Functional Comparative Anatomy of Internal Organ Systems. Cap: Adrenal. Pag. 167-169.
19. **Florez JL. 1997.** Efecto del Estrés en la captura y esquila sobre los niveles de cortisol sanguíneo y fórmula leucocitaria relativa en Vicuñas (*Vicugna vicugna*). Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú. 70 pp.
20. **Gantz I, Fong TM. 2003.** The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Mar; 284(3):E468-74.
21. **Gázquez A, A Blanco. 2004.** Tratado de Histología Veterinaria. Editorial MASSON S.A. Barcelona, España. Pág.356 – 362.
22. **Gélvez L. 2009.** Animales y producción. Disponible en: http://mundo-pecuario.com/tema232/glandulas_adrenales_animales.html
23. **Gonzales G. 1994.** Endocrinología en las grandes alturas. *Acta Andina* 1994; 3 (2): 83-111. Colección Digital SISBIB UNMSM. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/Acta_Andina/v03_n2/Endocrino

24. **Guerra-García R; J Coyotupa; W Losno; J Sumar. 1975.** Estudios de la función adrenal en la alpaca (*Lama pacos*). Resum 6º Jorn Peruana Endocrinol: Resumen 29. Cajamarca, Perú.
25. **Gutiérrez C; JA Corbera; M Morales; MC Juste; JA Montoya. 2001.** Algunos aspectos adaptativos de los camélidos a su medio. VII Congreso Anual de la Sociedad Española de Medicina Interna Veterinaria. Las Palmas de Gran Canaria, 17-20 octubre de 2001, España.
26. **Habel RE. 1968.** Anatomía y Manual de Disección de los Rumiantes Domésticos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. Pág. 51.
27. **Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. 2003.** Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo- pituitary- adrenocortical responsiveness. Front Neuroendocrinol. 2003 Jul; 24(3):151-80.
28. **Ishimura K; H Fujita. 1997.** Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes. Microsc Res Tech. 1997 Mar 15; 36(6):445-53.
29. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012.** Resultados definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Disponible en: <http://proyectos.inei.gob.pe/web/DocumentosPublicos/ResultadosFinalesIVCENAGRO.pdf>
30. **Johnson EO; Kamilaris TC; Chrousos GP and Gold PW. 1992.** Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. Neurosci Biobehav Rev. 16: 115-130.
31. **Junqueira LC; J Carneiro. 2006.** Histología Básica. Editorial MASSON S.A. 6ta Edición. Barcelona, España. Pág. 398 - 404.
32. **König HE, Liebich HG. 2005.** Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color. Editorial Medica Panamericana. Tomo II. Pp 283-285.
33. **Montalvo C. 1977.** Estructura microscópica de la glándula adrenal de la alpaca. Resúm 5º Cong Nacional Biología. Cuzco, Perú.
34. **Nabipour A, Khanzadi S, Behdegani A. 2008.** Gross and histological study on the adrenal glands in camel (*Camelus dromedaries*). Journal of Camel Practice and Research. 2008; 15 (1):121-125.
35. **[NAV] Nómina anatómica veterinaria, 2012.** Fifth edition, Published by the Editorial Committee, Hannover (Germany), Columbia, MO (U.S.A.), Ghent (Belgium), Sapporo (Japan).

36. **Núñez Q. 1968.** Estructuras Anatómicas que diferencian ciertos órganos de algunos animales domésticos. Boletín de Divulgación N° 2. IVITA FMV –UNMSM. Lima, Perú.
37. **Ríos C, Zapata B, Marín MP, Pacheco S, Rivera K, González B, Riveros JL, Bas F. 2003.** Cambios hematológicos, bioquímica sanguínea y cortisol sérico en crías de guanaco (*Lama guanicoe*) en cautiverio desde el nacimiento al destete. Avances en Ciencias Veterinarias, Vol. 1 y 2 (enero-diciembre). Chile. pp. 47-53.
38. **Ruiz S, Coy P, Gadea J, Matás C, Romar R, García F. 2008.** Tema 6: Corteza adrenal. Material de clase del curso Fisiología Animal. Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.
39. **Sisson S, JD Grossman, R Getty. 1990.** Anatomía de los Animales Domésticos Vol. I y II. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España. Pág. 176-177.
40. **Webb PD. 1980.** Development of the adrenal cortex in the fetal sheep: an ultrastructural study. J Dev Physiol. 1980 Jun;2 (3):161-81.
41. **Webb PD, DH Steven. 1981.** Development of the adrenal cortex in the fetal foal: an ultrastructural study. J Dev Physiol. 1981 Feb;3 (1):59-73.
42. **Wheeler JC. 1988.** Origin and evolution of the south american camelidae. En: Selected papers from the 60th Western Veterinary conference. Las Vegas. 290-300 p.
43. **Yang C, David M, Wang Z, Stoll B, Lackeyram D, Kendall C. 2011.** Apical Na⁺-D-glucose cotransporter 1 (SGLT1) activity and protein abundance are expressed along the jejunal crypt-villus axis in the neonatal pig. Am J Physiol- Gastr L 300: 60-70.
44. **Zanuzzi C. 2010.** Efectos de la intoxicación con *Solanum glaucophyllum* (duraznillo blanco) sobre la proliferación, diferenciación y muerte celular en el intestino de conejos. Tesis de Doctorado. Argentina: Univ Nacional de La Plata. 286 p.

APENDICE

ANEXO 1. PROTOCOLO INMUNOHISTOQUIMICA ABC

DESPARAFINADO

1. Neo Clear 1: 15 minutos
2. Neo Clear 2: 15 minutos

HIDRATACION

3. Etanol 100% 1: 10 minutos
4. Etanol 100% 2: 10 minutos

BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDOGENA

5. Metanol (200ml+ 4ml de agua oxigenada): 30 minutos

CONTINUACIÓN DE HIDRATACIÓN

6. Alcohol 96° 1: 5 minutos
7. Alcohol 96° 2: 5 minutos
8. Alcohol 70°: 5 minutos
9. Alcohol 50°: 5 minutos

LAVADO:

10. Lavado en PBS: 5 minutos
11. Lavado en PBS: 5 minutos
12. Lavado en PBS: 5 minutos

RECUPERACION ANTIGENICA:

13. Buffer citrato (estandarizar a ph 6 con HCl) en horno microondas a 750watts: 10 minutos
14. Dejar enfriar

LAVADO:

15. Lavado en PBS: 5 minutos

16. Lavado en PBS: 5 minutos

17. Lavado en PBS: 5 minutos

INACTIVACION DE UNIONES INESPECIFICAS:

18. Aplicar BSA 1% en cámara húmeda a temperatura ambiente: 30 minutos

ANTICUERPO PRIMARIO: (anticuerpo a trabajar, generalmente diluido 1:100)

19. Aplicar en toda la muestra en cámara húmeda y dejar reposar hasta el día siguiente en refrigeración.

LAVADO:

20. Lavado en PBS: 5 minutos

21. Lavado en PBS: 5 minutos

22. Lavado en PBS: 5 minutos

ANTICUERPO SECUNDARIO (según el kit para monoclonal o policlonal)

23. Aplicar en cámara húmeda y dejar reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

LAVADO:

24. Lavado en PBS: 5 minutos

25. Lavado en PBS: 5 minutos

26. Lavado en PBS: 5 minutos

ENZIMA AB (según el kit para monoclonal o policlonal):

27. Aplicar en cámara húmeda y dejar reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

LAVADO:

28. Lavado en PBS: 5 minutos

29. Lavado en PBS: 5 minutos

30. Lavado en PBS: 5 minutos

REVELADO:

31. Aplicar DAB... hasta observar marcación y apuntar el tiempo que demoró en marcar... cortar la reacción con agua corriente.

ENJUAGUE:

32. Lavado en agua corriente: 5 minutos

33. Lavado en agua destilada: 5 minutos

COLORACIÓN DE CONTRASTE:

34. Hematoxilina de Harris: 5 segundos y enjuagar en agua corriente para eliminar el excedente de colorante.

FIJACIÓN DEL COLORANTE:

35. Agua corriente: 5 minutos

ENJUAGUE:

36. Agua destilada: 5 minutos

DESHIDRATACIÓN:

37. Alcohol 50°: 5 minutos

38. Alcohol 70°: 5 minutos

39. Alcohol 96° 1: 5 minutos

40. Alcohol 96° 2: 5 minutos

41. Etanol 100% 1: 5 minutos

42. Etanol 100% 2: 5 minutos

43. Neo Clear 1: 5 minutos

44. Neo Clear 2: 5 minutos

MONTAJE:

45. Neomont o Bálsamo de Canadá: 10 segundos. Limpieza de la lámina después de 48 horas con Neo Clear para retirar restos de pegamento.